



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado  
Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y  
Geográfica  
Unidad de Posgrado

**Estudio citogenético convencional y de genotoxicidad  
en *Rhoadsia altipinna* (Characiformes) del río Dos  
Bocas, El Oro, Ecuador**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias  
Ambientales

**AUTOR**

Omar Rogerio SÁNCHEZ ROMERO

**ASESOR**

Dra. Sonia Ruthy VALLE RUBIO

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Sánchez, O. (2019). *Estudio citogenético convencional y de genotoxicidad en Rhoadsia altipinna (Characiformes) del río Dos Bocas, El Oro, Ecuador*. Tesis para optar grado de Doctor en Ciencias Ambientales. Unidad de Posgrado, Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

## HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

**CODIGO ORCID DEL AUTOR:** <https://orcid.org/0000-0003-1381-3222>

**CODIGO ORCID DEL ASESOR:** <https://orcid.org/0000-0001-9019-1100>

**DNI:** 0702244674

**GRUPO DE INVESTIGACIÓN:** Investigación individual

**INSTITUCIÓN QUE FINANCIA PARCIAL O TOTALMENTE LA INVESTIGACIÓN:** Universidad Técnica de Machala

***UBICACIÓN GEOGRÁFICA DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN. DEBE INCLUIR LOCALIDADES Y COORDENADAS GEOGRÁFICAS:***

Río Dos Bocas, Sector La Cadena, Parroquia El Progreso, Cantón Pasaje, Ecuador, cuyas coordenadas son 03° 16'07.6"S; 079° 44'14.8"W .

**AÑO O RANGO DE AÑOS QUE LA INVESTIGACIÓN ABARCÓ:**

2014 - 2018



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
Universidad del Perú, Decana de América  
**FACULTAD DE INGENIERÍA GEOLÓGICA, MINERA, METALÚRGICA Y GEOGRÁFICA**  
UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

**SUSTENTACIÓN PÚBLICA**

En la Universidad Nacional Mayor de San Marcos-Lima, a los veintinueve días del mes de noviembre del 2019, siendo las 15:00 horas, se reúnen los suscritos miembros del JURADO EXAMINADOR DE TESIS, nombrado mediante Dictamen N.º 813/UPG-FIGMMG/2019 del 13 de noviembre del 2019, con la finalidad de evaluar la sustentación oral de la siguiente tesis:

**TÍTULO**

«ESTUDIO CITOGÉNÉTICO CONVENCIONAL Y DE GENOTOXICIDAD EN *Rhoadsia altipinna* (CHARACIFORMES) DEL RÍO DOS BOCAS, EL ORO, ECUADOR»

Que, presenta el Mg. **OMAR ROGERIO SÁNCHEZ ROMERO**, para optar el **GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES**.

El secretario del Jurado Examinador de la Tesis, analiza el expediente N.º 05617-FIGMMG-2013 del 25 de julio del 2013, en el marco legal y Estatutario de la Ley Universitaria, acreditando que tiene todos los documentos y cumplió con las etapas del trámite según el «Reglamento de los Estudios de Maestría y Doctorado».

Luego de la Sustentación de la Tesis, los miembros del Jurado Examinador procedieron a aplicar la escala descrita en el Art. 61 del precitado Reglamento, correspondiéndole al graduando la siguiente calificación:

..... Bueno (15) .....

Habiendo sido aprobada la sustentación de la Tesis, el Presidente recomienda a la Facultad se le otorgue el **GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES** al Mg. **OMAR ROGERIO SÁNCHEZ ROMERO**.

Siendo las 16:00 horas, se dio por concluido al acto académico

DRA. RINA LASTENIA RAMÍREZ MESÍAS  
Presidente

DRA. ZOILA RAQUEL SICCHA RAMÍREZ  
Secretaria

DR. MISAEL GUEVARA PAREDES  
Miembro

DRA. SONIA VALLE RUBIO  
Asesor

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a mis padres, Oscar e Isabel †, quienes con sus sabios consejos y apoyo me guiaron siempre en busca de los mejores resultados, a mi esposa Betsabé, mi fortaleza, a mis hijos Steeven Omar, Génesis Isabel, Aldo Patricio y David Senén, quienes son el motor que me estimula día a día, a todos GRACIAS.

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero agradecer a todos los maestros de la UNMSM que colaboraron en el presente trabajo, especialmente a la Dra. Sonia Valle Rubio, tutora, Dra. Raquel Siccha R. miembro del tribunal, Dr. Carlos Cabrera Carranza, Director de Postgrado, Dra. Rina Ramírez Mesías, presidente del tribunal y al Dr. Mauro Nirchio Tursellino por los conocimientos compartidos.

## ÍNDICE GENERAL

	Págs.
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTO	III
ÍNDICE GENERAL	IV
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE ANEXOS	IX
RESÚMEN	X
ABSTRACT	XI
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>1</b>
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Situación Problemática	1
1.2 Formulación del Problema	5
1.2.1 Problema General	5
1.2.2 Problemas Específicos	5
1.3 Justificación de la Investigación	5
1.4 Objetivos de la Investigación	6
1.4.1 Objetivo General	6
1.4.2 Objetivos Específicos	7
1.5 Formulación de Hipótesis	7
1.5.1 Hipótesis General	7



<b>CAPITULO 2</b>	8
2. MARCO TEÓRICO	8
2.1 Antecedentes del Problema	8
2.1.1 Marco legal	10
2.2 Técnicas usadas	11
2.2.1 Test de micronúcleos	11
2.2.2 Estudios citogenéticos	11
2.2.2.1 Estimulación de Mitosis	11
2.2.2.2 Preparaciones Cromosómicas Mitóticas	11
2.2.2.3 Número diploide, cariotipo, número fundamental	11
2.2.2.4 Patrón de distribución de Bandas C	12
2.2.2.5 Número y distribución de Regiones Organizadoras del Nucléolo	12
2.3 Glosario	13
<b>CAPÍTULO 3</b>	20
3. METODOLOGÍA	20
3.1 Área de estudio	20
3.2 Características del área de estudio	21
3.2.1 Aspectos ecológicos del río Dos Bocas	21
3.2.2 Actividades socio-económicas de la zona	22
3.3 Método de captura de especímenes e identificación	22
3.4 Características de la especie objeto de estudio ( <i>R. altipinna</i> )	23
3.4.1 Clasificación taxonómica de <i>R. altipinna</i>	24
3.5 Determinación del porcentaje de micronúcleos	25
3.5.1 Extracción de sangre	25
3.5.2 Realización de frotis	25
3.5.3 Registro de datos	26
3.5.4 Tamaño de muestra, diseño experimental y Análisis estadísticos	26

3.6	Análisis citogenético	27
3.6.1	Ensayo de Hibridación Fluorescente in situ	28
<b>CAPÍTULO 4</b>		29
4.	RESULTADOS	29
4.1	Resultados del estudio de Genotoxicidad en <i>Rhoadsia altipinna</i>	29
4.1.1	Número de eritrocitos fotografiados	31
4.2	Resultados del Análisis Citogenético	35
4.2.1	Características Citogenéticas.	35
5.	DISCUSIÓN	38
5.1	Test de micronúcleo	38
5.2	Análisis Citogenético	40
6.	CONCLUSIONES	42
7.	RECOMENDACIONES	43
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
9.	ANEXOS	57

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b>	Río Dos Bocas, sector La Cadena - El Progreso. Cantón Pasaje	20
<b>Figura 2.-</b>	Macho (a) y Hembra (b) de especímenes de <i>R. altipinna</i> .	24
<b>Figura 3a.-</b>	Anomalías nucleares de <i>R. altipinna</i> inducidas por el Cloruro de mercurio.	30
<b>Figura 3b.-</b>	Representación de los diferentes tipos de anomalías morfológicas nucleares de los eritrocitos de <i>R. altipinna</i> , detectados en este estudio.	30
<b>Figura 4.-</b>	Variación en la proporción de células micronucleadas (PCMN) en función de la concentración de Cloruro de mercurio (Hg Cl <sub>2</sub> ).	33
<b>Figura 5.-</b>	Variación en la proporción de células micronucleadas en función del tiempo de exposición.	33
<b>Figura 6.-</b>	Cromosomas de <i>R. altipinna</i> (macho). (a) cariotipo con tinción de Giemsa, M: Metacéntrico; SM: submetacéntrico; St-A: Subtelocentrico-acrocéntrico; (b) metafases somáticas con bandas C.	36
<b>Figura 7.-</b>	Metafase sometida a Hibridación fluorescente <i>in situ</i>	37

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Breve detalle de la Ictiofauna del río Dos Bocas	59
<b>Tabla 2</b>	Puntos de muestreo y número de peces colectados de <i>Rhoadsia altipinna</i>	23
<b>Tabla 3</b>	Clasificación taxonómica de <i>Rhoadsia altipinna</i>	24
<b>Tabla 4</b>	Muestreo para la descripción de cariotipo de <i>Rhoadsia altipinna</i>	27
<b>Tabla 5</b>	Muestreo para el test de micronúcleo	27
<b>Tabla 6</b>	Número total de eritrocitos fotografiados	31
<b>Tabla 7</b>	Resumen estadístico de MN/2000 Cel a cada concentración de $\text{HgCl}_2$ ( $\mu\text{g}$ /ml)	32
<b>Tabla 8</b>	Prueba de Kruskal-Wallis para MN/2000 Cel por $\text{HgCl}_2$ ( $\mu\text{g}$ /ml)	32
<b>Tabla 9</b>	Medias para MN/2000 Cel por Tiempo (horas) con intervalos de confianza del 95,0%	34
<b>Tabla 10</b>	Prueba de Kruskal-Wallis para MN/2000 Cel. por Tiempo (horas)	34

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b>	Condensado de las entrevistas y matrices de preguntas	57
<b>Anexo 2</b>	Breve detalle de la Ictiofauna del río Dos Bocas	59
<b>Anexo 3</b>	Artículo: First description of the karyotype and localization of major and minor ribosomal genes in <i>Rhoadsia altipinna</i> Fowler, 1911 (Characiformes, Characidae) from Ecuador. Comparative cytogenetics (Sánchez-Romero <i>et al.</i> , 2015)	60

## RESUMEN

El empleo de peces como organismos centinela o bioindicadores para monitorear el efecto genotóxico de metales pesados mediante el test de micronúcleos, ha demostrado ser de gran utilidad por la sensibilidad de estos organismos a bajas concentraciones de ese elemento químico. En este trabajo se presentan los resultados del Test de micronúcleos para establecer la sensibilidad de *Rhoadsia altipinna* (Characiformes: Characidae) al Cloruro de Mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ). Adicionalmente, se presenta el estudio citogenético para disponer de información base de esta especie endémica del Ecuador que pueda ser de utilidad para buscar marcadores cromosómicos asociados a efectos genotóxicos del mercurio. Tras la administración por vía intraperitoneal de cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) en dosis de 0,1; 0,25 y 0,50  $\mu\text{g}$  de  $\text{HgCl}_2$  /g de peso de cada pez (como control fue empleando un grupo inyectado con agua destilada) fue posible detectar varias anomalías nucleares en los eritrocitos de *R. altipinna*. El análisis estadístico de las frecuencias de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica entre los grupos de peces sometidos a concentraciones ensayadas de  $\text{HgCl}_2$  y entre los tiempos de exposición, revelaron diferencias estadísticas significativas ( $<0,05$ ) atribuibles tanto a la concentración de mercurio como al tiempo de exposición con un incremento proporcional de los rangos medios de la frecuencia de células micronucleadas a medida que aumenta la concentración  $\text{HgCl}_2$  y el tiempo de exposición. El análisis citogenético reveló un complemento  $2n=50$  (10M+26SM+14ST) FN=86, con Ag-NOR localizadas en las porciones terminales de los brazos cortos del par de cromosomas N°12 y con heterocromatina en posición paracentromérica en 44 cromosomas. Los resultados obtenidos indican que la especie en estudio puede ser empleada como un organismo indicador para monitorear el estado ambiental de los cuerpos de agua aledaños a las áreas de la Provincia de El Oro en las que se emplea el mercurio para la explotación artesanal e industrial de oro. Se propone la posibilidad de usar características

citogenéticas para establecer con precisión el tipo de daños genotóxicos inducidos en *Rhoadsia altipinna* por la exposición al mercurio.

## ABSTRACT

The use of fish as sentinel organisms or bioindicators to monitor the genotoxic effect of heavy metals through the micronucleus test has proven to be very useful and this is because of the sensitivity of these organisms to low concentrations to that chemical element.

In this paper, the results of the micronucleus test are presented to establish the sensitivity of *Rhoadsia altipinna* (Characiformes: Characidae) to Mercury Chloride ( $\text{HgCl}_2$ ). Additionally, the cytogenetic study is presented to obtain basic information of this endemic species from Ecuador that may be useful to look for chromosomal markers associated with the genotoxic effects of mercury. After intraperitoneal administration of mercuric chloride ( $\text{HgCl}_2$ ) in doses of 0.1; 0.25 and 0.50  $\mu\text{g}$  of  $\text{HgCl}_2$  / g of the weight of each fish (as control was using a group injected with distilled water) it was possible to detect several nuclear anomalies in the erythrocytes of *R. altipinna*.

The statistical analysis of the frequencies of micronuclei in peripheral blood erythrocytes between the groups of fish subjected to tested concentrations of  $\text{HgCl}_2$  and between the exposure times, revealed significant statistical ( $< 0,05$ ) differences attributable both to the mercury concentration and to the time of exposure with a proportional increase in the mean ranges of the micronucleated cell frequency as the concentration of mercury chloride ( $\text{HgCl}_2$ ) increases and the exposure time increases.

The cytogenetic analysis revealed a complement  $2n = 50$  (10M + 26SM + 14ST) FN = 86, with Ag-NOR located in the terminal portions of the short arms of the pair of chromosomes No. 12 with heterochromatin in paracentromeric position in 44 chromosomes.

The results obtained indicate that the species under study can be used as an indicator organism to monitor the environmental status of the bodies of water adjacent to the areas of El Oro Province where mercury is used for artisanal

and industrial gold exploitation. The possibility of using cytogenetic characteristics to accurately establish the type of genotoxic damage induced in *Rhoadsia altipinna* by exposure to mercury is proposed.



# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Situación Problemática

La presión antropogénica producto del crecimiento de la población y del desarrollo de las ciudades ha traído como consecuencia la generación de una considerable cantidad de desechos que son transportados por las descargas de aguas residuales, drenajes provenientes de la actividad agrícola y de la actividad minera y que finalmente van a parar al hábitat acuático ocasionando perturbación en su equilibrio natural, degradación y en muchos casos una ruptura del mismo (Rovira, 1993; Kiely, 1999; Márquez *et al.*, 2008; Mero, 2010; Gil *et al.*, 2012).

Entre estos contaminantes, los conocidos como metales pesados (término que se aplica a cualquier elemento metálico que tenga una densidad relativamente alta y que sea tóxico o venenoso), aun en bajas concentraciones, son de notable interés ya que son extremadamente tóxicos y acumulables por los organismos que los absorben, los cuales a su vez son fuente de contaminación de las cadenas alimenticias al ser ingeridos por alguno de sus eslabones (Lenntech, 2004). Entre estos, el mercurio (Hg) es considerado como uno de los metales más peligrosos introducidos por interferencias humanas en el entorno natural (Buhl, 1997) y es constantemente empleado en investigación científica debido a su alta toxicidad (Morcillo *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2011; Anual, 2014).

El mercurio (Hg) es un metal blanco, color plata brillante, a temperatura ambiente se mantiene en estado líquido y de uso común en termómetros y en algunos interruptores eléctricos. Si el mercurio no está encapsulado, este es metálico, se evapora parcialmente formando vapores incoloros e inodoros y se lo encuentra en tres formas básicas: mercurio elemental, inorgánico y orgánico (Córdova, 2006; Carmona *et al.*, 2005).

En la naturaleza se encuentra en la corteza terrestre, mayoritariamente en forma de sulfuros. El sulfuro mercúrico (HgS) o cinabrio, es el principal compuesto rico en mercurio y contiene más de un 70% de Hg (Berlin y Zalups, 2007). El mercurio puede encontrarse en distintas concentraciones, en el aire y el agua, debido a la desgasificación de la corteza terrestre, actividad volcánica, erosión y disolución de los minerales de las rocas (Liu *et al.*, 2014; Tassi *et al.*, 2016).

En aguas dulces y marinas no contaminadas, se encuentra en concentraciones de 0,01 y 0,02 µg/L, respectivamente, siendo el mercurio el único metal que se halla en mayor concentración en aguas marinas. Además, la concentración de mercurio es similar entre el hemisferio norte (0,0033 µg/L) y el sur (0,0011 µg/L), a pesar de la diferencia de industrialización entre ambos (Díaz Mayans *et al.*, 1993).

Una parte importante de mercurio proviene de la actividad agrícola, en las que se emplea fungicidas como acetato de fenilmercurio o acetato de metilmercurio, actualmente prohibidos (Berlin y Zalups, 2007; United Nations Environment Programme UNEP, 2002). Por otro lado, los desechos provenientes de las actividades industriales son los responsables de la mayor parte del mercurio liberado al medio. Se presume que la actividad minera es responsable del 50% de la entrada de mercurio al medio ambiente, seguida por el uso de combustibles fósiles, plantas cloro-alcálinas, industrias papeleras, industrias eléctricas, etc. (Berlin y Zalups, 2007; Grandjean, 2017; Korringa y Hagel, 1974; Walker, 2016).

Otras fuentes comunes en las que el mercurio y sus compuestos se encuentran presentes, son baterías, luces fluorescentes, material dental, etc. Aproximadamente, unas 10.000 toneladas de mercurio se liberan al medio, cada año, debido a las actividades humanas (Reilly, 1991; UNEP, 2002).

El mercurio que ha alcanzado las aguas superficiales o suelos, entra en la cadena trófica (Marcano y Troconis, 2001) y debido a que los peces tienen la capacidad de almacenar en su organismo una concentración mayor de mercurio en comparación con la presente en el medio acuoso (Olmedo *et al.*,

2013; Cardoso *et al.*, 2013), la ingesta de este metal por parte del ser humano, a través de peces y alimentos de origen marino y/o dulceacuícola representa un problema de salud pública, dada su toxicidad en el desarrollo neurológico en fetos y niños (Swain *et al.*, 2007; National Research Council NRC, 2000). Estudios realizados en peces depredadores como tiburones o atún, tanto frescos como congelados, han demostrado que éstos presentan mayor concentración del mercurio en comparación con los eslabones inferiores en la cadena trófica (Dabeka *et al.*, 2004).

Un ejemplo importante por las consecuencias que produjo en la década de los 50 es el que se conoce como la enfermedad de Minamata o Síndrome de Minamata, el cual es un desorden del sistema nervioso causado por la ingesta de productos marinos contaminados con compuestos de metilmercurio vertidos desde la planta de Minamata (hoy en día conocida como Chisso Hiryo Company), empresa instalada en la Bahía de Minamata, cerca del río Agano en Japón, que vertía sus residuos tóxicos de mercurio inorgánico de forma descontrolada al mar, desencadenando un síndrome neurológico grave que afectó a los pescadores de la zona y sus familias (Crespo-López *et al.*, 2005; Yacuzzi, 2008)

El mercurio tiene propiedades mutagénicas porque impide la polimerización de la tubulina, una subunidad estructural de los microtúbulos que participa en la organización del citoplasma y es también un componente de las fibras del huso mitótico, causando la contracción de cromosomas, un retraso en la división del centrómero y un movimiento más lento en el anafase (Thier *et al.*, 2003; Nabi, 2014).

Debido a que los peces son considerados como un importante indicador de contaminación de mercurio en agua por su capacidad para almacenar una mayor concentración de mercurio en comparación con el que se presente en el medio acuoso (Ávila-Pérez, 1995), pueden ser empleados para monitorear los daños genéticos provocados por genotóxicos. Esto se logra, empleando, entre otros, el Test Micronúcleos que es un método sensible y rápido para establecer la presencia de daños ocasionados por dosis muy bajas de sustancias tóxicas a nivel del contenido nuclear (DNA).

El micronúcleo (MN) es una anomalía originada por la pérdida de fragmentos cromosomales o de cromosomas acéntricos que no son incorporados en el núcleo de la célula hija en la mitosis por la carencia de centrómeros, aunque también pueden originarse de cromosomas completos que se pierden por ruptura o mala formación del huso acromático (Minissi *et al.*, 1996; Venier *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 1998; Campana *et al.*, 2001; Urech *et al.*, 2001). La proporción en tamaño de los MN es marcadamente más pequeña que el núcleo principal (1/5 a 1/20) (Heddle, 1973; Al-Sabti y Metcalfe, 1995) aunque en peces puede ser aún de menor tamaño, debido a que la mayoría de los cromosomas de peces son mucho más pequeños (e.g. 1/10 a 1/30 del tamaño del núcleo principal) que los cromosomas de los mamíferos (Al-Sabti y Metcalfe, 1995).

Considerando que no existe información sobre los daños genéticos causados por metales pesados en la ictiofauna ecuatoriana, es importante disponer de información básica como punto de referencia y evaluar las diferencias entre individuos sanos e individuos afectados por la presencia de metales pesados. Bajo esta premisa, el propósito de este estudio es examinar la sensibilidad de *Rhoadsia altipinna* al mercurio para evaluar el potencial de la especie como organismo centinela o bioindicador cuando son expuestos a cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ).

*Rhoadsia altipinna* pertenece a la familia Characidae la cual incluye 15 subfamilias reconocidas; entre éstas la subfamilia Rhoadsiinae contiene 8 especies válidas (Eschmeyer y Fong, 2014) de las cuales dos de ellas son las que se encuentran en Ecuador, *R. altipinna* y *R. minor* (Barriga, 2012). Debido a que es de fácil captura, tolera la manipulación y el cautiverio *R. altipinna* tiene el potencial de ser empleada como un organismo centinela para monitorear los efectos genotóxicos de compuestos químicos presentes en el medio ambiente que son exógenos a la composición natural de los seres vivos, también conocidos como xenobióticos.

Como información base se inició con la descripción del cariotipo de la especie en estudio, que no había sido descrita anteriormente y con la finalidad de contar con información de línea base que permita, a futuro,

realizar comparaciones para identificar daños cromosómicos en peces expuestos al mercurio.

## **1.2. Formulación del Problema**

### **1.2.1. *Problema General***

¿Es posible utilizar a *Rhoadsia altipinna* para detectar problemas ambientales, específicamente por exposición al mercurio mediante el Test de micronúcleo?

### **1.2.2. *Problemas Específicos***

#### **1.2.2.1. *Problema Específico 1.***

¿Cuál es la frecuencia de aparición de células micronucleadas en *Rhoadsia altipinna* expuestas a concentraciones subletales de mercurio inorgánico?

#### **1.2.2.2. *Problema Específico 2.***

¿Es posible emplear el cariotipo de *Rhoadsia altipinna* para establecer una línea base de comparación para futuros estudios?

## **1.3. Justificación de la Investigación**

Además de jugar un rol importante en la red trófica, los peces acumulan sustancias residuales (metales pesados) y responden a bajas concentraciones de tóxicos (Minissi *et al.*, 1996) por lo que pueden ser empleados como bio-indicadores. Algunas especies han sido empleadas como bioindicadores para estos fines (Junín *et al.*; 2008). Además, su fácil manipulación, permite que puedan ser inyectados por vía intraperitoneal (IP) o mantenidos en acuarios que contienen las dosis del químico (Hayashi *et al.*, 1998) facilitando la realización de bioensayos controlados.

El Test de Micronúcleos es una prueba muy empleada para determinar el daño genotóxico generado por distintas sustancias químicas y elementos físicos. Mediante esta prueba se determina el daño causado por los agentes

mutagénicos sobre los cromosomas, identificando fragmentos acéntricos y/o cromosomas rezagados (Martínez, 2005). Los micronúcleos son masas de cromatina que se parecen al núcleo principal y son vistos como pequeños núcleos en el citoplasma de las células interfásicas. Es una clase de núcleo de menor tamaño, en comparación con el que se encuentra habitualmente. Se puede identificar fácilmente a través de una microscopia de luz en la célula después de sacar la muestra respectiva, previamente preparada y con tinción del frotis, posibilitando observar la cantidad de micronúcleos presentes en los eritrocitos y policromáticos (Carranza, 2011).

Si el organismo al que se le aplicó la dosis del elemento tóxico o contaminante muestra un alto número de células micronucleadas en comparación con un grupo control, entonces se concluye que el químico utilizado es capaz de inducir daño estructural en el DNA y/o en el número de cromosomas (Venier *et al.*, 1997; Campana *et al.*, 2001).

Los peces son un excelente modelo para evaluar el peligro potencial de los productos químicos introducidos en el medio ambiente acuático, debido a que tienen una gran capacidad para metabolizar xenobióticos y acumular contaminantes, además de su alta sensibilidad a la inducción de daños en el ADN (Mir *et al.*, 2014).

Por otro lado, el estudio de las características del cariotipo en los peces también puede brindar la posibilidad de monitorear el efecto genotóxico de diferentes agentes contaminantes a través de la determinación de anomalías en cromosomas metafásicos (Palíková *et al.*; 2007) por lo que se requiere, en primera instancia conocer el cariotipo normal para establecer comparaciones.

## **1.4. Objetivos de la Investigación**

### **1.4.1. Objetivo General**

Establecer la sensibilidad de *Rhoadsia altipinna* al Cloruro de Mercurio ( $\text{Hg Cl}_2$ ) con el fin de usar esta especie como bioindicador para evaluar los

potenciales daños genéticos por la exposición al mercurio en estudios de monitoreo ambiental.

#### **1.4.2. Objetivos Específicos**

1.- Determinar la frecuencia de aparición de micronúcleos en *Rhoadsia altipinna* durante 96 horas de exposición a diversas concentraciones de cloruro de mercurio ( $\text{Hg Cl}_2$ ), (0, 10, 25 y 50  $\mu\text{g/ml}$ ).

2.- Determinar las características citogenéticas de *Rhoadsia altipinna* del río Dos Bocas en El Oro, Ecuador, mediante técnicas convencionales y moleculares.

### **1.5. Formulación de Hipótesis**

#### **1.5.1. Hipótesis General**

La frecuencia de aparición de micronúcleos en los eritrocitos de sangre periférica de la especie *R. altipinna* es un buen indicador de daños genotóxicos inducidos por la exposición al mercurio inorgánico.

## **CAPÍTULO 2**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. Antecedentes del Problema**

En la Provincia El Oro, en Ecuador, existe una marcada actividad minera a pequeña escala, que surgió, a finales de los años 70, a raíz de la quiebra de la Compañía Industrial Minera Asociada –CIMA- (una empresa de capital mixto privado y público) que explotaba oro al sur del Ecuador, en la zona de Portovelo-Zaruma, luego de la salida de la empresa South American Development Company – SADCO- hacia mediados del siglo XX (Sandoval, IIED, 2001).

A efectos de maximizar la producción de oro, las empresas mineras que actúan en diferentes partes del mundo también utilizan mercurio, si bien se sabe desde hace décadas que el mercurio genera efectos graves sobre los ecosistemas y la salud humana. (Movimiento Mundial por los Bosques Tropicales, WRM, 2004).

La presencia de agentes tóxicos en ambientes dulceacuícolas sumados a los cambios ambientales son factores causantes del estrés celular, el cual se manifiesta en mortalidad de los individuos, mutaciones y pérdida de la diversidad genética de las poblaciones (Sotil *et al.*, 2007). La contaminación por metales pesados en la naturaleza y principalmente en las masas de agua, es en la actualidad un fenómeno de interés mundial debido a la toxicidad y persistencia durante varias décadas, así como a su bioacumulación y biomagnificación en la cadena alimenticia (Rajeshkumar y Munuswamy, 2011).

Los metales pesados se encuentran naturalmente en el medio ambiente en cantidades mínimas y la mayoría de ellos son esenciales para el metabolismo normal de los peces y demás organismos acuáticos, pero altas concentraciones inducen toxicidad directa (Bradl, 2005).



Los peces son particularmente importantes como indicadores para estudios de contaminantes con potencial mutagénico y carcinogénico presentes en los ecosistemas acuáticos, puesto que son capaces de metabolizar, concentrar y almacenar los xenobióticos, (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Matsumoto y Cólus, 2000; Ali *et al.*, 2008).

En las últimas décadas se ha evidenciado la importancia de la evaluación de material genético para la validación y aplicación de biomarcadores para determinar la exposición a agentes que puedan dañar la molécula de DNA (Xu *et al.*, 1999; Cajaraville *et al.*, 2000; Sarkar *et al.*, 2006).

El análisis de micronúcleos como técnica para evaluar los efectos genotóxicos de los xenobióticos en organismos acuáticos, ha sido aplicado en diversos invertebrados marinos, por ejemplo en el mejillón cebra *Dreissena polymorpha* (Mersch *et al.*, 1996), mejillón verde *Perna viridis* (Xu *et al.*, 1999; Siu *et al.*, 2004), el mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Taleb *et al.*, 2007); en peces marinos como *Gadus morhua* y *Scophthalmus maximus* (Bardiene *et al.*, 2005); en peces de agua dulce como *Astyanax bimaculatus* (Matsumoto y Cólus, 2000), *Labeo bata* y *Oreochromis mossambicus* (Talapatra *et al.*, 2006), y *Danio reiro* (Prieto *et al.*, 2007), entre otros.

*Rhoadsia altipinna* pertenece al orden de los Characiformes, un grupo de peces de agua dulce distribuidos en América y África y que ha sido reconocido como el que presenta la mayor diversidad en las principales cuencas neotropicales (Buckup, 1998). Dentro de los Characiformes, la familia Characidae es la más grande y compleja, con 1063 especies válidas (Eschmeyer y Fong, 2014). Estos peces tienen la distribución geográfica más amplia dentro de este orden, ocupando casi todos los ambientes de agua dulce, con una distribución en el continente americano que va desde México - Estados Unidos hasta el Sur de Argentina (Lucena, 1993).

Estudios cromosómicos en la Zona Neotropical se han realizado para 475 especies de Characiformes (Oliveira *et al.*, 2009). En Ecuador, entre los peces de agua dulce, el orden Siluriformes tiene el mayor número de especies (365) seguido por el de los Characiformes (345) y el de los

Gymnotiformes (44) (Barriga, 2012), pero los datos sobre sus características citogenéticas son muy limitados y apenas han comenzado a aparecer en la literatura científica formal en los últimos 5 años (Nirchio *et al*, 2015; 2016; 2017; 2018; 2019<sup>a</sup>)

### **2.1.1. Marco legal**

La Constitución de la República del Ecuador vigente establece claramente en su Artículo 72 que "...En los casos de impacto ambiental grave o permanente, incluidos los ocasionados por la explotación de los recursos naturales no renovables, el Estado establecerá los mecanismos más eficaces para alcanzar la restauración, y adoptará las medidas adecuadas para eliminar o mitigar las consecuencias ambientales nocivas"; en el Artículo 73 señala que "El Estado aplicará medidas de precaución y restricción para las actividades que puedan conducir a la extinción de especies, la destrucción de ecosistemas o la alteración permanente de los ciclos naturales" prohibiendo además, de manera expresa "la introducción de organismos y material orgánico e inorgánico que puedan alterar de manera definitiva el patrimonio genético nacional". Además, en su Artículo 400 define que el Estado ejercerá la soberanía sobre la biodiversidad, y declara de interés público la conservación de la biodiversidad y todos sus componentes, en particular la biodiversidad agrícola y silvestre y el patrimonio genético del país (Registro Oficial de Ecuador, 2008).

El Test de micronúcleo, aparece como una forma de uso práctico y de fácil aplicación para estudios de contaminación en el medio ambiente. Esta técnica es de alta sensibilidad, bajo costo, flexible porque permite trabajar con cualquier tejido, de fácil aplicación y requiere de periodos de experimentación cortos, que permite evidenciar daños en la vida acuática a consecuencia de xenobióticos (Tice *et al.*, 2000).

En este sentido, se pretende demostrar que el uso de esta técnica de MN en la especie objetivo del presente estudio puede ser empleada como organismo centinela (bioindicador) para obtener información para control y supervisión de la biodiversidad confiere a esta investigación pertinencia y por

lo tanto la enmarca dentro de lo establecido en el Artículo 73 de la constitución ecuatoriana.

## **2.2 Técnicas usadas**

### **2.2.1. Test de Micronúcleo**

Durante la división celular, el núcleo se replica y divide en forma equitativa y da lugar a dos células idénticas. En ocasiones pueden producirse anomalías debido a modificaciones durante la replicación y posterior división del DNA, a roturas cromosómicas, sustancias genotóxicas y al efecto de radiación y pueden producir entre otras cosas la pérdida de cromosomas haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo (Zalacaín *et al.*, 2005). Los fragmentos cromosómicos acéntricos o cromosomas enteros que han quedado rezagados en anafase durante la división nuclear y quedan excluidos sin incorporarse correctamente al núcleo de la célula hija dan origen a un nuevo núcleo de menor tamaño que el primero, denominado “micronúcleo” (MN), el que se visibiliza con facilidad al microscopio óptico, (Zalacaín *et al.*, 2005; Fenech, 2006, 2007; Samanta y Dey, 2010).

### **2.2.2. Estudios Citogenéticos.**

#### **2.2.2.1. Estimulación de Mitosis**

Esta técnica se emplea para obtener un mayor número de células mitóticas en peces a través de la inyección intramuscular o intraabdominal de una suspensión de levadura y fue inicialmente descrita por Cole y Leavens (1971) para anfibios y reptiles y utilizada por Lee y Elder (1980) para pequeños mamíferos y aplicada en peces por primera vez por Oliveira *et al.* (1988 a, b) y Lozano *et al.* (1988).

#### **2.2.2.2 Preparaciones Cromosómicas Mitóticas**

Las preparaciones cromosómicas en peces pueden ser obtenidas mediante el método de preparación directa descrito por Bertollo *et al.* (1978).

#### **2.2.2.3 Número diploide, cariotipo, número fundamental**

El cariotipo es el patrón cromosómico de una especie expresado a través de la descripción del número, tamaño y forma de cada tipo de elementos del set completo de cromosomas agrupados en pares homólogos y ordenados según su tamaño y forma, desde el más grande al más pequeño (Matthey, 1945, 1965). El número de cromosomas generalmente se determina en la mitosis y es denominado número diploide ( $2n$ ), excepto en organismos poliploides en cuyo caso es citado el número base o número de cromosomas del genoma de la serie original haploide (Matthey, 1945, 1965). El número de cromosomas es generalmente constante en una especie, así como también la forma, tamaño, posición del centrómero. Un descriptor citogenético común es el número total de brazos o número fundamental (NF), el cual es definido como la cantidad de brazos cortos y largos presentes en un cariotipo (Matthey, 1945, 1965) y es un indicador de la proporción de cromosomas acrocéntricos frente a la cantidad de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos presentes en un cariotipo (Nirchio y Oliveira, 2006).

#### ***2.2.2.4 Patrón de distribución de Bandas C.***

El término bandas-C se emplea para designar las regiones de heterocromatina constitutiva que predominantemente contienen secuencias de DNA altamente repetidas e inactivas durante la transcripción. La técnica de bandeo-C más comúnmente utilizada (Sumner, 1972) involucra la depurinización de la cromatina con tratamiento ácido (HCl), desnaturalización del DNA con tratamiento alcalino (BaOH), quiebre de las cadenas de DNA en los sitios depurinizados y remoción de las cadenas de DNA desnaturalizado en solución salina caliente (2xSSC) (Comings, 1978) lo que permite, luego de la tinción con colorante de Giemsa, revelar bloques más intensamente coloreados que el material cromosómico restante, el cual presenta una coloración más pálida.

#### ***2.2.2.5 Número y distribución de Regiones Organizadoras del Nucléolo (RONs).***

El nucléolo está constituido por DNA ribosomal (rDNA), RNA ribosómico (rRNA) y proteínas y es responsable de la formación de los ribosomas que son las estructuras ligadas a la síntesis proteínica en el citoplasma celular. En realidad, el nucléolo corresponde a las regiones donde se localizan las secuencias de rDNA responsables de la transcripción que, aun estando localizadas en cromosomas distintos, se asocian íntimamente y se denominan Regiones Organizadoras del Nucléolo (NORs) (Nirchio y Oliveira, 2014). En los peces, las NORs generalmente se encuentran localizadas en constricciones secundarias de los cromosomas y pueden ser observadas en uno o más pares de cromosomas (Nirchio *et al.*, 2001; 2003a,b; Nirchio *et al.*, 2007, 2008; Alves *et al.*, 2012 ) y su número, posición y localización cromosómica es especie-específica para varios grupos de peces (Kavalco *et al.*, 2005; Nirchio *et al.*, 2005; Diniz *et al.*, 2009). Las NORs, pueden ser visualizadas por el método de paso único de Howell y Black (1980). Esta técnica se basa en la afinidad que presenta el Nitrato de Plata por las proteínas nucleolares, las cuales, probablemente persistan en la región de la constricción secundaria durante todo el ciclo celular, permitiendo colorear los nucléolos en interfase y dichas regiones en cromosomas metafásicos.

## 2.3 Glosario

### A

**Acéntrico:** Cromosoma (o fragmento) que carece de centrómero.

**Aneugénico:** Agentes químicos que, a nivel molecular, impiden la fijación de las fibras del huso al cinetocoro y, por ende, el desplazamiento de cromosomas en la anafase.

**Anafase:** Es una de las etapas de la mitosis y de la meiosis, dos métodos de reproducción celular. En anafase se produce la separación de los pares de cromosomas que son homólogos.

### B

**Bandas C:** Término que se emplea para designar las regiones de heterocromatina constitutiva que predominantemente contienen secuencias de DNA altamente repetidas e inactivas durante la transcripción.

**Bioacumulación:** En toxicología, es el proceso de acumulación de sustancias químicas en organismos vivos de forma que estos alcanzan concentraciones más elevadas que las concentraciones en su medio o en los alimentos. Las sustancias propensas a la bioacumulación alcanzan concentraciones crecientes a medida que se avanza en el nivel trófico en la cadena alimenticia. En función de cada sustancia, esta acumulación puede producirse a partir de fuentes abióticas (suelo, aire, agua), o bióticas (otros organismos vivos).

**Biomagnificación:** Es un proceso de bioacumulación de una sustancia tóxica. Ésta se presenta en bajas concentraciones en organismos al principio de la cadena trófica y en mayor proporción a medida que se asciende en dicha cadena. Esto significa que las presas tienen menor concentración de sustancias tóxicas que el depredador.

**Biomarcador:** Conocido también como marcador biológico es aquella sustancia utilizada como indicador de un estado biológico. Debe poder medirse objetivamente y ser evaluado como un indicador de un proceso biológico normal, estado patogénico o de respuesta a un tratamiento farmacológico. Los biomarcadores son medidas en los niveles molecular, bioquímico o celular, tanto en poblaciones naturales provenientes de hábitats contaminados, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes. Este indicador señala la exposición del organismo a sustancias tóxicas y la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante.

## C

**Carcinogénico:** Que produce cáncer o favorece su aparición.

**Cariotipo:** Dotación cromosómica completa de un individuo o una especie, que puede observarse durante la mitosis. El término también se refiere a la presentación gráfica de los cromosomas, ordenados en pares de homólogos y que se puede describir conforme a una nomenclatura convencional.

**Centrómero:** Región del cromosoma que separa los dos brazos y en la que se unen las dos cromátides. Es la región de unión a las fibras del huso acromático durante la división celular.

**Characidae:** Es una familia (caracidos) de peces de agua dulce subtropical y tropicales, del orden de los Characiformes.

**Citogenética:** Parte de la biología que estudia los cambios estructurales de los cromosomas, los mecanismos de la meiosis y la mitosis, etc.

**Clastógeno:** En biología, es un agente mutagénico que da lugar a o induce a la interrupción o rotura de cromosomas, lo que lleva a que secciones de cromosomas sean eliminadas, añadidas, o reorganizadas. Este proceso es una forma de mutagénesis, y puede conducir a la carcinogénesis, cuando las células que no son muertas por el efecto clastogénico pueden convertirse en cancerosas.

**Constricciones Secundarias:** La región organizadora nucleolar (o NOR, del inglés: nucleolar organizer region) es el sitio del cromosoma donde se localizan los “clusters” de genes ribosómicos (rDNA), que codifican para el ARN ribosómico y que está asociado a una constricción secundaria. Se localizan en un número de cromosomas que varía dependiendo de cada especie. La existencia de una constricción secundaria en esa región cromosómica, hace que al segmento cromosómico existente entre la constricción secundaria y el extremo del cromosoma, se le denomine satélite cromosómico, de ahí la denominación de cromosomas SAT a aquellos cromosomas donde se encuentran las NORs.

**Cromatina:** Es el conjunto de DNA y proteínas que se encuentra en el núcleo de las células eucariotas y que constituye el cromosoma eucariótico.

**Cromosoma:** Es un paquete ordenado de DNA que se encuentra en el núcleo de la célula. Los organismos, dependiendo de la especie tienen diferentes números de cromosomas.

## D

**DNAr (DNA ribosomal):** Es una secuencia de DNA contenida en los cromosomas del nucléolo que codifica ARN ribosómico. Estas secuencias regulan la transcripción e iniciación de la amplificación y contienen

segmentos espaciadores transcribibles y no transcribibles. Las unidades de transcripción del ARN ribosómico se agrupan en tándem. Estas regiones de rDNA se denominan también regiones de organización del nucléolo.

## E

**Endemismo:** Es un término utilizado en biología para indicar que la distribución de un taxón está limitada a un ámbito geográfico reducido y que no se encuentra de forma natural en ninguna otra parte del mundo. Por ello, cuando se indica que una especie es endémica de cierta región, significa que solo es posible encontrarla de forma natural en ese lugar.

**Especie centinela (Bioindicadores):** Es aquella capaz de acumular contaminantes en sus tejidos y ser utilizada para detectar riesgos para los seres humanos al proporcionar alerta anticipada de un peligro. Estas especies pueden ser más susceptibles o tener mayor exposición a un peligro que las propias personas.

## G

**Genotóxicidad:** Es la capacidad para causar daño al material genético por agentes físicos, químicos o biológicos; el daño en el material genético incluye no sólo al DNA, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula.

## H

**Heterocromatina constitutiva:** Cromatina transcripcionalmente inactiva que muestra alta condensación durante la interfase y se replica al final de la fase S del ciclo celular (heterocromatina constitutiva). La heterocromatina facultativa está constituida por eucromatina que adquiere las características de la heterocromatina en determinados estadios del desarrollo.

**Huso Mitótico:** Aparato compuesto por microtúbulos que aparece en muchas células eucarióticas al comienzo de la división nuclear y es responsable por la separación ordenada de los cromosomas, los cuales se unen a las fibras del huso por sus centrómeros.



## I

**Interfase:** Período del ciclo celular comprendido entre dos divisiones sucesivas.

## M

**Metafase:** Es la segunda fase de la mitosis y de la meiosis que sucede después de la profase en donde ésta pierde la envoltura y aparecen los microtúbulos del huso acromático (también llamado meiótico o mitótico). Este alineamiento equilibrado en la línea media del huso se debe a las fuerzas iguales y opuestas que se generan por los cinetocoros hermanos.

**Micronúcleos:** Son masas de cromatina que aparecen en el citoplasma de la célula interfásica y son el resultado de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros que no se han orientado correctamente en la anafase.

**Microtúbulos:** Son estructuras celulares formadas por polímeros proteicos, de 25 nm de diámetro exterior y unos 12 nm de diámetro interior, con longitudes que varían entre unos pocos nanómetros a micrómetros, que se originan en el Centro organizador de microtúbulos (MTOC en inglés) y que se extienden a lo largo de todo el citoplasma. Se hallan con diferentes características en las células eucariotas y en las procariotas. Están formadas por la polimerización de un dímero de dos proteínas globulares, la alfa y la beta tubulina.

**Mitosis:** Es el proceso celular por el cual se producen dos núcleos idénticos en preparación para la división celular. En general, la mitosis va seguida inmediatamente del reparto equitativo del núcleo celular, así como del resto del contenido celular en dos células hijas.

**Mutagénesis:** En genética se denomina mutagénesis a la producción de mutaciones sobre DNA, clonado o no. De realizarse *in vitro*, dicha alteración puede realizarse al azar (mutagénesis al azar), sobre cualquier secuencia, o bien de forma dirigida (mutagénesis dirigida) sobre una secuencia conocida y en la posición de interés. En el caso de realizarse *in vivo*, sobre organismos y no sobre DNA clonado por tanto, se realiza a gran escala y sin conocimiento de secuencia, empleando para ello sustancias denominadas mutágenos.

## N

**Nucléolo:** estructuras dentro del núcleo de algunas células, sitios de síntesis de ARN ribosómico y ensamblaje de ribosomas.

**Número Fundamental:** es la cantidad de brazos cortos y largos presentes en un cariotipo y es un indicador de la proporción de cromosomas acrocéntricos frente a la cantidad de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos presentes en un cariotipo.

## P

**Proteínas:** Llamados también prótidos son macromoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos.

## R

**Regiones Organizadoras Del Nucléolo:** Regiones donde se localizan las secuencias de rDNA responsables de la transcripción que, aun estando localizadas en cromosomas distintos, se asocian íntimamente y se denominan Regiones Organizadoras del Nucléolo (NORs).

**Rhoadsiinae:** Es una subfamilia de peces de agua dulce de la familia Characidae. Se encuentra subdividida en 4 géneros. Algunas de sus especies son denominadas comúnmente con el nombre de sabaletas, sardinitas, tetras carlanas, etc. Habitan en lagunas, arroyos, y ríos en regiones templadas y cálidas de América Central y del Sur, desde Nicaragua hasta Ecuador y Brasil. La especie de mayor tamaño (*Parastremma sadina*) alcanza los 18 cm de longitud total.

**Ribosomas:** Son complejos macromoleculares de proteínas y ácido ribonucleico (ARN) presentes en todas las células (excepto en los espermatozoides). Son los centros celulares de traducción que hacen posible la expresión de los genes. Es decir, se encargan de sintetizar proteínas a partir de la información contenida en el DNA, que llega transcrita a los ribosomas en forma de ARN mensajero (ARNm).

## S

**Sinténico:** Se dice de dos o más genes que están localizados en el mismo cromosoma, tanto si están en ligamiento como si no.

**Subletal:** Dícese del veneno o sustancia tóxica que se recibe con una dosis ligeramente inferior a la que es necesaria para producir la muerte.

## T

**Toxicidad:** Presencia de sustancias tóxicas en la composición de un alimento, medicamento o cualquier otro producto; grado o nivel de toxicidad.

**Transcripción:** Proceso de síntesis de una molécula de ARN mensajero por acción de la ARN-polimerasa, tomando como molde la cadena antisentido del DNA genómico. Este es el primer paso de la expresión génica.

**Tubulina:** Se refiere a una familia de proteínas globulares de 55 Kdalton. La familia de las tubulinas está formada por las tubulinas alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ), que comparten una identidad entre sus cadenas de aminoácidos de 35-40%, aunque su similitud con cualquier otra proteína conocida es mínima.

## X

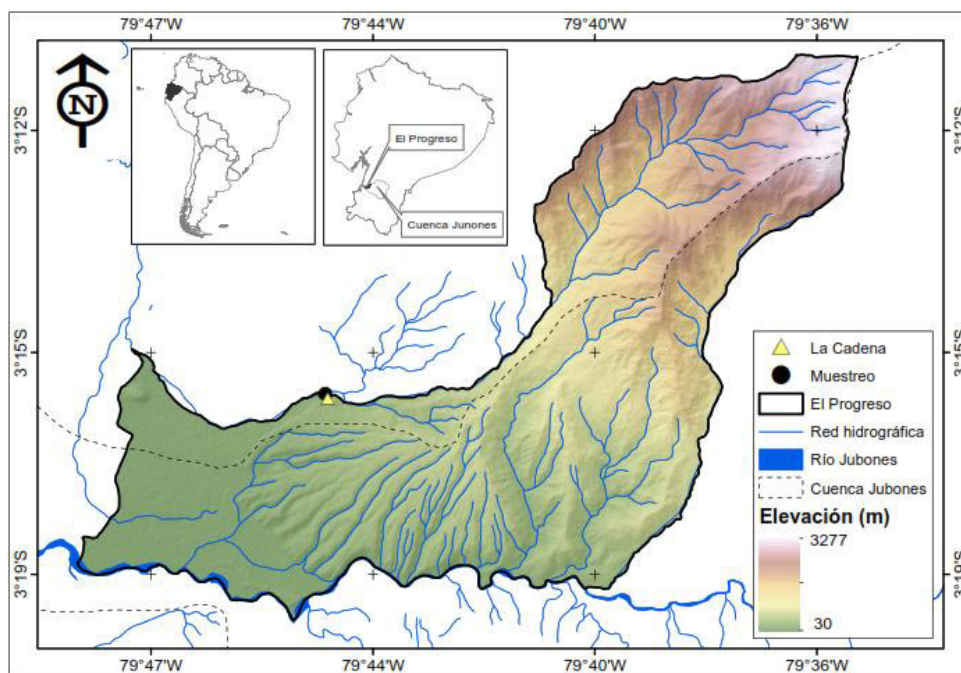
**Xenobiótico:** La palabra xenobiótico deriva del griego *xeno* ('extraño') y *bio* ('vida'). Se aplica a los compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el ser humano en el laboratorio. La mayoría ha aparecido en el medio ambiente durante los últimos 200 años.

## CAPÍTULO 3

### METODOLOGÍA

#### 3.1 Área de estudio

La colecta de los peces se realizó en el Río Dos Bocas (Parroquia EL Progreso; Sector La Cadena), Cantón Pasaje ( $03^{\circ}16'07.6''\text{S}$ ;  $079^{\circ}44'14.8''\text{W}$ ) que forma parte de la Cuenca del Jubones, Provincia de El Oro, al Sur del Ecuador (Figura 1). Los peces fueron transportados hasta el laboratorio en bolsas plásticas de 20 L de capacidad a las cuales se les agregó 1/3 del volumen de agua y 2/3 de oxígeno puro. El trabajo fue realizado en el Lab. de



**Figura 1.** Río Dos Bocas, Sector La Cadena, Parroquia El Progreso, Cantón Pasaje, Ecuador, cuyas coordenadas son  $03^{\circ}16'07.6''\text{S}$ ;  $079^{\circ}44'14.8''\text{W}$ . Fuente. El autor (Software Quantum Gis)

Citogenética de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala (UTMACH).

## **3.2 Características del área de estudio**

### **3.2.1. Aspectos ecológicos del río Dos Bocas**

La descripción ecológica-ambiental de la zona del río Dos Bocas se fundamenta en el documento “Actualización del Plan de desarrollo y ordenamiento territorial 2015 – 2020” del Gobierno Autónomo descentralizado de la Parroquia rural El Progreso y del reconocimiento *in situ* y entrevistas a los habitantes del sector (Anexo 1).

La localidad conocida como Dos Bocas se encuentra ubicada al Noreste de la cabecera cantonal en el sitio la Cadena a 11,10 km en la Parroquia Rural El Progreso y es uno de los destinos turísticos de la región visitada durante todo el año. Posee una densa vegetación, amplias rocas lisas y es de aguas cristalinas. Su nombre se origina por la confluencia del Río Chaguana y el Río Águila que forman un solo rápido. La temperatura promedio es de 26 grados centígrados. Entre los componentes de la Flora destacan el cacao tradicional y orgánico, papaya, mandarina, naranjas, fruta de pan, banano seda y filipino, limón, zapote, naranja, guanábana, mamey, guaba, grosella; además algunos árboles maderables como laurel (*Cordia alliodora*), algarrobo (*Prosopis chilensis*), Figueroa (*Carapa guianensis Aubel*), Pachaco (*Schizolobium parahybum*), etc.

En cuanto a la ictiofauna, a partir de colectas realizadas en acompañamiento al Dr. Mauro Nirchio, durante su vinculación con la Universidad Técnica de Machala a través del Proyecto Prometeo, fueron colectadas diecinueve especies que se encuentran depositadas en la colección ictiológica de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y que permiten tener una idea de la

diversidad de la ictiofauna local, entre las cuales la que presenta la mayor abundancia es *R. altipinna*. (Anexo 2)

Otros vertebrados presentes incluyen reptiles y aves identificados mediante avistamiento por los habitantes del sector quienes indican la presencia de serpientes X (*Bothrops punctatus*), colambo (*Drymarchon melanuru*), coral (*Micrurus margariferu*), chonta (*Clelia equatoriana*), algunas variedades de lagartijas (*Leposoma parietale*), ranas (*Kuriy allpapuyu*). Entre las aves mencionan al garrapatero (*Crotophaga ani*), loros (*Amazona aestiva*), perdiz (*Alectoris rufa*), palomas silvestres (*Zenaida asiática*), horneros (*Furnarius leucopus*), algunas variedades de colibríes (*Archilochus colubris*), pacharacos (*Ortalis Garrula*), puerco sajino (*Pecari tajacu*), iguanas (*Iguana iguana*), etc.

### **3.2.2 Actividades socio-económicas de la zona**

A partir de encuestas realizadas a los pobladores del sitio (Anexo 1) se recopiló información que permitió obtener datos sobre las actividades socio-económicas en la zona, las cuales se fundamentan en la agricultura, primordialmente en la siembra del cacao y cultivo de cítricos, además de otras actividades como la pesca, cría de porcinos y avicultura. Algunos moradores del sector se dedican a actividades de turismo ya que la zona es un destino turístico reconocido, unos pocos a la ganadería a pequeña escala y algunos también a la minería artesanal que, según se presume, podría estar ocasionando alguna contaminación en los ríos de la zona.

### **3.3 Método de captura de especímenes e identificación.**

La colecta de los ejemplares de *Rhoadsia altipinna* se realizó mediante atarraya, este es un arte de pesca empleado para la captura de diversas especies acuáticas ya sea de ríos, esteros o bahías, y en función de la especie que se desea capturar se determinan las características de la red (tamaño de “ojo de malla”), para el presente trabajo se utilizó una de 3m de diámetro con “ojo de malla” de 0,5 pulgadas, de esta forma se evita que los peces capturados se lastimen. Para la identificación se empleó la

descripción de la especie en Géry (1977). Los puntos de colecta se indican en la tabla 2.

**Tabla 2**

*Puntos de muestreo y número de peces colectados de Rhoadsia altipinna*

Puntos de muestreo	Georeferenciación		# de individuos capturados por punto
			SUBTOTAL
Estación 1	Latitud	3°16'8.24"S	31
	Longitud	79°44'13.86"O	
Estación 2	Latitud	3°16'7.87"S	32
	Longitud	79°44'18.10"O	
Estación 3	Latitud	3°16'8.09"S	28
	Longitud	79°44'22.29"O	
Estación 4	Latitud	3°16'9.14"S	32
	Longitud	79°44'25.29"O	
<b>TOTAL :</b>			<b>123</b>

E

laborado: El autor

Fuente. Datos del autor

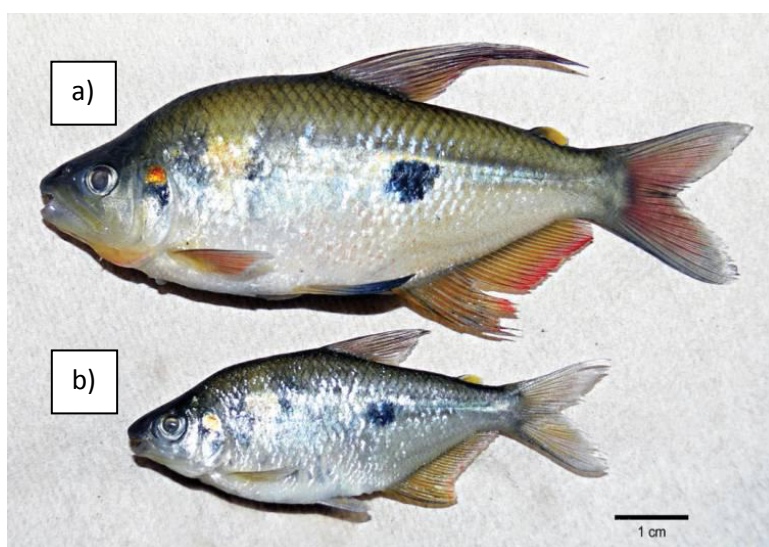
### 3.4 Características de la especie *Rhoadsia altipinna*

*Rhoadsia altipinna* es un pez perteneciente a la subfamilia Rhoadsiinae (Characiformes: Characidae). Es una especie caracterizada por un evidente dimorfismo sexual (Figura 2). El género contiene sólo dos especies, *R. altipinna* y *R. minor* (Gery, 1977). El género *Rhoadsia* tiene aproximadamente 37-41 escamas laterales y la línea lateral perforada solo en las primeras 10-20 escamas. *R. altipinna* crece hasta 170 mm y está restringida a las tierras bajas. *R. minor* vive en una altitud de no más de 1000 metros y se distingue de *R. altipinna* por ser más alargada. Ambas

tienen una gran mancha negra muy característica en los lados a nivel de la aleta dorsal. Las aletas no emparejadas de *R. minor* son rojas y amarillas (Gery, 1977).

*R. altipinna* y *R. minor* son comunes en Ecuador y Perú, donde tienen importancia ecológica. *R. altipinna* se la encuentra en la región suroeste del sur del río Guayas y al norte del Perú, mientras que *R. minor* se halla en los sistemas fluviales en el noroeste de Ecuador (Barriga, 2012).

La baja diversidad de especies y la distribución geográfica peculiar de las especies de Rhoadsiinae en Ecuador convierten a *R. altipinna* en un objetivo de estudio interesante desde la perspectiva evolutiva y de conservación, ya que, en la parte occidental de Ecuador, muchas localidades dentro del rango de distribución de la subfamilia se encuentran bajo la condición de amenaza relativamente grave (Loh *et al.*, 2014).



**Figura 2. Macho (a) y Hembra (b) de especímenes de *R. altipinna*.**

### **3.4.1 Clasificación taxonómica de *R. altipinna***

<i>Rhoadsia altipinna</i> Taxonomía	
<b>Reino:</b>	Animalia
<b>Filo:</b>	Chordata



<b>Clase:</b>	Actinopterygii
<b>Subclase:</b>	Neopterygii
<b>Infraclase:</b>	Teleostei
<b>Superorden:</b>	Ostariophysi
<b>Orden:</b>	Characiformes
<b>Familia:</b>	Characidae
<b>Subfamilia</b>	Rhoadsiinae
<b>Género:</b>	<i>Rhoadsia</i>
<b>Especie:</b>	<i>R. altipinna</i>

**Tabla 3**

*Clasificación taxonómica de la R. altipinna.*

*Fuente:* <http://www.fishbase.org>

### 3.5 Determinación del porcentaje de micronúcleos.

Para la determinación del porcentaje de micronúcleos, se establecieron cuatro grupos de 24 ejemplares cada uno. Cada grupo fue confinado en acuarios de 80cm x 60cm x 30 cm (144 Litros), los cuales se ubicaron en el Laboratorio de Citogenética de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala (UTMACH).

El cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) fue inyectado por vía intrabdominal con jeringa de insulina. Según recomiendan Al-Sabti y Metcalfe (1995), esta vía de administración presenta menos problemas en cuanto a la manipulación

del organismo y vertido de contaminantes en el agua. Se aplicaron dosis de 10, 25 y 50 µg/ml de mercurio las cuales se inyectaron a razón de 1 ml de solución por cada 100 gramos de pez de tal modo que cada pez se expuso a una concentración de 0,1; 0,25 y 0,50 µg de HgCl<sub>2</sub>/g de peso en cada grupo de tratamiento, mientras que a los peces del grupo de control se les inyectó 1 ml de agua por 100 g de peso. Los peces no fueron alimentados mientras duró la prueba.

### **3.5.1 Extracción de sangre**

Cada 24 horas hasta las 96 horas de exposición, se obtuvo una muestra de sangre de un lote de 6 individuos escogidos al azar por cada tratamiento. Para la toma de las muestras de sangre, se insertó la aguja de una jeringa, previamente heparinizada (Heparina sódica de procedencia porcina), en ángulo recto respecto a la superficie ventral del pez (al nivel del primer y segundo radio de la aleta anal) y se aspiró aproximadamente 0,5 ml de sangre (Argungu *et al.*, 2017).

### **3.5.2 Realización del frotis**

Para la realización del frotis se colocó una gota de sangre en un extremo de un portaobjetos bien limpio y con la ayuda de otra lámina, en ángulo de 45°, se realizó el extendido. Las preparaciones fueron fijadas con metanol puro durante 10 minutos y se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente, los extendidos fueron teñidos con colorante de Giemsa diluído al 5% en buffer fosfato, pH 6,8 (0,68% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0,72% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) durante 10 minutos en una jarra de Coplin con capacidad para 10 láminas. (Al-Sabti y Metcalfe, 1995).

### **3.5.3 Registro de datos**

Con la ayuda de un fotomicroscopio Olympus se procedió a tomar una serie de 15-20 fotografías (con un objetivo 100X), al azar, en cada una de las placas obtenidas de los diferentes especímenes. El recuento de cada tipo celular fue realizado con la ayuda de la herramienta de conteo del software Adobe Photoshop.

### 3.5.4 Tamaño de muestra, diseño experimental y Análisis estadísticos

El tamaño de la muestra analizada en el test de micronúcleos para cada tiempo en cada concentración probada fue de 6 ejemplares lo cual está por encima del número recomendado de 3-4 individuos por tratamiento y asegura que ésta sea estadísticamente representativa (Belpaeme *et al.*, 1996; Kandiel *et al.*, 2014; Sepici-Dincel *et al.*, 2011). Para cada ejemplar fueron contados 2.000 eritrocitos y los datos fueron expresados en N° de micronúcleos/2000 eritrocitos.

Fueron calculados y tabulados el promedio, Desviación Estándar, Coeficiente de Variación, Mínimo y Máximo. Para establecer la existencia o no de diferencias estadísticas entre el número de Micronúcleos y los tratamientos a diferentes concentraciones de Cloruro de Mercurio ( $\text{Hg Cl}_2$ ) a cada tiempo de exposición, y ante la ausencia de normalidad y homocedastidad de los datos, los resultados fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Todos los análisis fueron realizados según el criterio de Sokal y Rohlf (1979) empleando el software Statgraphics Centurion (2009).

Para el análisis de cariotipo fueron empleados 12 ejemplares de *Rhoadsia* y en cada uno de ellos se analizó no menos de 30 células, así el cariotipo representa un dato confiable para el presente trabajo.

**Tabla 4**

*Muestreo para la descripción del Cariotipo de Rhoadsia altipinna*

<b>Muestras de individuos de <i>R. altipinna</i></b>		<b>Células analizadas por individuo para descripción de Cariotipo.</b>
6 machos	n=12	n=30
6 hembras		

**N. TOTAL células analizadas**

**n=360**

*Fuente: Elaborado con datos del autor*

**Tabla 5**

*Muestreo para el test de micronúcleo.*

<b>Tiempo</b>	<b>Concentración de Cloruro de mercurio</b>			
	<b>0 µg/ml</b>	<b>10 µg/ml</b>	<b>25 µg/ml</b>	<b>50 µg/ml</b>
<b>24 Horas</b>	n=6	n=6	n=6	n=6
<b>48 Horas</b>	n=6	n=6	n=6	n=6
<b>72 Horas</b>	n=6	n=6	n=6	n=6
<b>96 Horas</b>	n=6	n=6	n=6	n=6

*Fuente: Elaborado con datos del autor*

### **3.6 Análisis citogenéticos.**

Previo a la obtención de las suspensiones celulares para la determinación del cariotipo y a fin de garantizar disponer de un buen número de células en metafase, 24 horas antes de administrar la colchicina, los peces fueron inyectados con solución de levadura (Fleischmann) (Lee y Elder, 1980). Para las preparaciones cromosómicas se siguió el método descrito en Nirchio y Oliveira (2006). Los cromosomas fueron clasificados según su morfología en una de cuatro clases principales según la nomenclatura propuesta por Levan *et al.* (1964) . Para preparar el cariotipo con los cromosomas ordenados según cada tipo (M, SM, ST y A) en orden de tamaño decreciente, las fotografías fueron procesadas digitalmente el software Adobe Photoshop CC ver. 2015.0.0. El patrón de heterocromatina constitutiva se determinó siguiendo la metodología de Sumner (1972). Para la determinación de las

regiones organizadoras del nucléolo (RONs) fue empleado el método de impregnación con Nitrato de Plata de Howell y Black (1980).

### **3.6.1 Ensayo de Hibridación Fluorescente *in situ***

La posición en los cromosomas de los genes ribosomales mayores y menores fue cartografiada mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en el laboratorio de Citogenética y Genética de Peces de la Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” en Botucatu, Sao Paulo, Brasil. El procedimiento empleado siguió la metodología descrita por Pinkel *et al.* (1986). Las sondas para los genes ribosomales 18S rDNA y 5S rDNA fueron aisladas mediante PCR a partir del genoma de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Steindachner, 1907). La sonda para el gen 18S-rDNA fue amplificada empleando los cebadores 18S F (5'CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT 3') y 18S R (5'CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA 3') (White *et al.*, 1990). Esta sonda fue marcada con Biotin-16-dUTP (Roche Applied Science) y las señales de hibridación detectadas mediante el empleo de Avidin-Fluoresceína conjugada (FITC). La sonda 5S-rDNA fue obtenida usando los cebadores 5S F (5'TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC 3') y 5S R (5'CAG GCT GGT ATG GCC GTA ACG 3') (Pendás *et al.*, 1994). Esta sonda fue marcada con Digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) y la detección de la señal de hibridación realizada Anti-Digoxigenin-Rhodamine (Roche Applied Science).

Las metafases del ensayo FISH fueron fotografiadas con un fotomicroscopio Olympus BX61 equipado con una cámara digital DP70. Las imágenes fueron procesadas digitalmente con ADOBE PHOTOSHOP CS6 Extended.

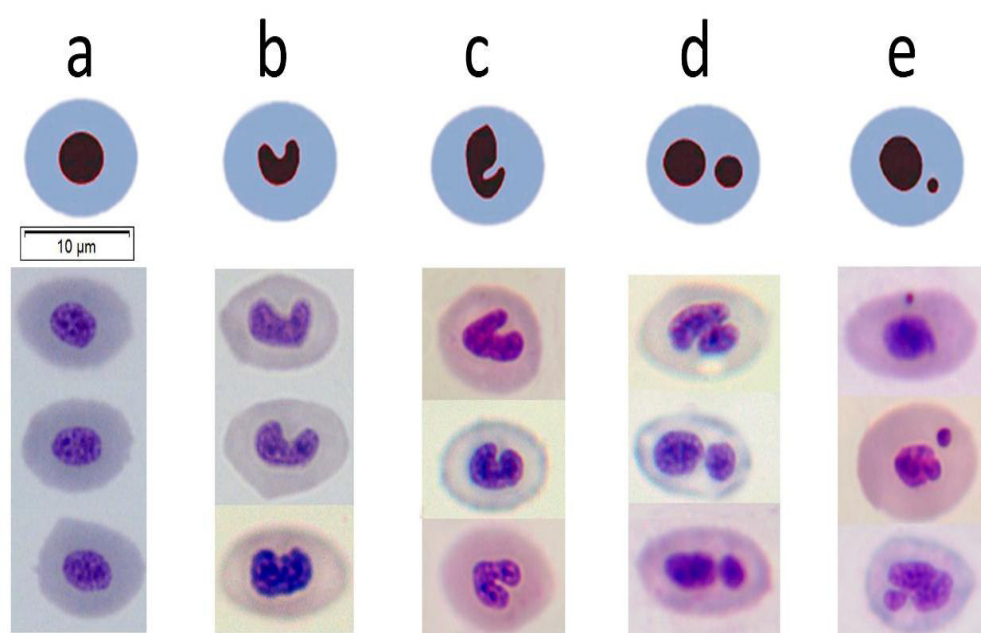


#### 4.1 Resultados del estudio de Genotoxicidad en *Rhoadsia altipinna*.

La administración de Cloruro de Mercurio ( $\text{Hg Cl}_2$ ) por vía intraperitoneal en las dosis ensayadas generó varias anomalías nucleares en las células sanguíneas de *R. altipinna*. En comparación con los eritrocitos normales que

mostraron un núcleo esférico y un citoplasma sin ningún agregado nuclear (Fig. 3A). Las flechas indican cada tipo de alteración nuclear: a) riñón, b) muesca, c) binucleado, d, e y f) micronúcleos de tamaño variable.

Los eritrocitos normales tuvieron caracterizados por un núcleo con una forma semejante a la de un riñón (Fig. 3A (a)), los eritrocitos con muesca presentan una rendija o hendidura uniforme bien definida que se extiende a una profundidad apreciable en un núcleo y que parece no contener cromatina y se encuentran demarcadas por la envoltura nuclear (Fig. 3A (b)); los eritrocitos binucleados con núcleos de similar tamaño (Fig. 3A (c)) y los eritrocitos micronucleados (EMN), que presentaron agregados de material nuclear no refringente circundante al núcleo de la célula, generalmente de 1/5 a 1/20 del tamaño del núcleo principal (Fig. 3A (d, e, f)).



**Figura 3B.** Representación de los tipos de anomalías morfológicas nucleares de los eritrocitos de *R. altipinna*, detectados en este estudio; a) normal; b) arrañonado; c) muesca; d) binucleados; e) micronucleados.

#### **4.1.1 Número de eritrocitos fotografiados**

Luego de iniciado el trabajo se tomaron alrededor de 20 fotos por placa, teniendo al final del mismo aproximadamente 480 fotos en los cuatro tratamientos, en cada una de las placas se contó unos 100 eritrocitos, dando al final 12000 eritrocitos contados por cada tratamiento cada 24 horas.

**Tabla 6**

*Número total de eritrocitos fotografiados*

<b>Tiempo</b>	<b>Núm. de eritrocitos x Tratamiento 0 µg/ml</b>	<b>Núm. de eritrocitos x Tratamiento 10 µg/ml</b>	<b>Núm. de eritrocitos x Tratamiento 25 µg/ml</b>	<b>Núm. de eritrocitos x Tratamiento 50 µg/ml</b>
<b>24h</b>	12000 eritrocitos	12000 eritrocitos	12000 eritrocitos	12000 eritrocitos
<b>48h</b>	12000 eritrocitos	12000 eritrocitos	12000 eritrocitos	12000 eritrocitos
<b>72h</b>	12000 eritrocitos	12000 eritrocitos	12000 eritrocitos	12000 eritrocitos
<b>96h</b>	12000 eritrocitos	12000 eritrocitos	12000 eritrocitos	12000 eritrocitos
<b>Subtotal</b>	48000	48000	48000	48000
<b>TOTAL</b>	<b>192000 Eritrocitos</b>			

*Fuente:* **Elaborado con datos del autor**

**Tabla 7**



*Resumen estadístico de MN/2000 Cel a cada concentración de HgCl<sub>2</sub> (µg/ml)*

<i>HgCl<sub>2</sub> (µg/ml)</i>	<i>N*</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coeficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
0	24	7,33333	2,23931	30,536%	4,0	12,0
10	24	8,29167	3,01416	36,3516%	3,0	15,0
25	24	13,7917	5,53235	40,1137%	6,0	29,0
50	24	22,1667	14,7078	66,3509%	5,0	59,0
Total	96	12,8958	9,91382	76,8761%	3,0	59,0

\*Tamaño de muestra

*Fuente: Elaborado con datos del autor*

**Tabla 8**

**Prueba de Kruskal-Wallis para MN/2000 Cel por HgCl<sub>2</sub> (µg/ml)**

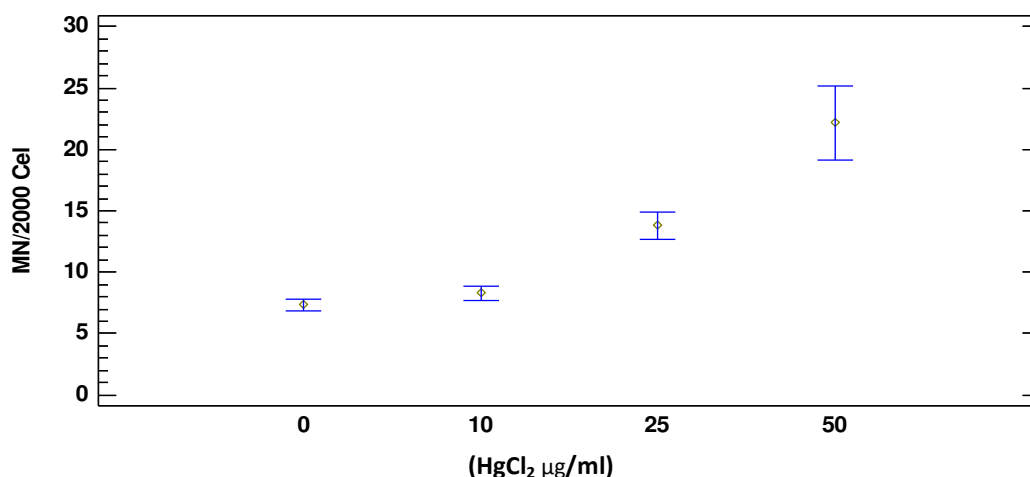
<i>HgCl<sub>2</sub> (µg/ml)</i>	<i>N</i>	<i>Rango Promedio</i>
0	24	28,125
10	24	34,9375
25	24	62,125
50	24	68,8125

**Estadístico = 37,2918 Valor-P = 3,99158E-8**

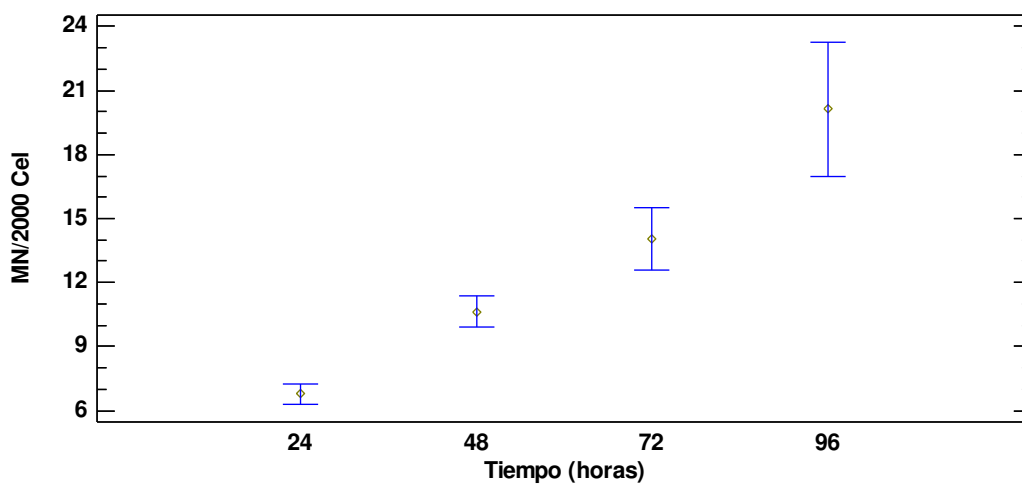
*Fuente: Elaborado con datos del autor*

En la Tabla 7 se indican los promedios, desviación estándar, coeficiente de variación y mínimo y máximo del recuento de micronúcleos /2000 eritrocitos a cada concentración ensayada, estos fueron analizados mediante prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis que demostró la existencia de diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) (Tabla 8).

Las figuras 4 y 5 muestran la variación en la proporción de eritrocitos micronucleados (EMN) en función de la concentración de Cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) administrada y del tiempo de exposición, respectivamente.



**Figura 4. Variación en la proporción de células micronucleadas (PCMN) en función de la concentración de Cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ).**



**Figura 5. Variación en la proporción de células micronucleadas en función del tiempo de exposición.**

En la Tabla 9 se indican los promedios y los intervalos de confianza al 95% para el número de micronúcleos /2000 eritrocitos a cada tiempo ensayado. Debido a la ausencia de normalidad de los datos, estos fueron analizados mediante prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis que demostró la existencia de diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) (Tabla 10).

**Tabla 9**

*Medias para MN/2000 Cel por Tiempo (horas) con intervalos de confianza del 95,0%*

<i>Tiempo (horas)</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coeficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
24	24	6,79167	2,35869	34,7291%	3,0	13,0
48	24	10,625	3,54858	33,3984%	5,0	22,0
72	24	14,0417	7,03086	50,0714%	5,0	30,0
96	24	20,125	15,4338	76,6895%	5,0	59,0
Total	96	12,8958	9,91382	76,8761%	3,0	59,0

*Fuente:* **Elaborado con datos del autor**

**Tabla 10**

*Prueba de Kruskal-Wallis para MN/2000 Cel. por Tiempo (horas)*

<i>Tiempo (horas)</i>	<i>N</i>	<i>Rango Promedio</i>
24	24	23,7292
48	24	50,0417
72	24	58,8958
96	24	61,3333

**Estadístico = 27,6807 Valor-P = 0,00000423796**

*Fuente:* **Elaborado con datos del autor**

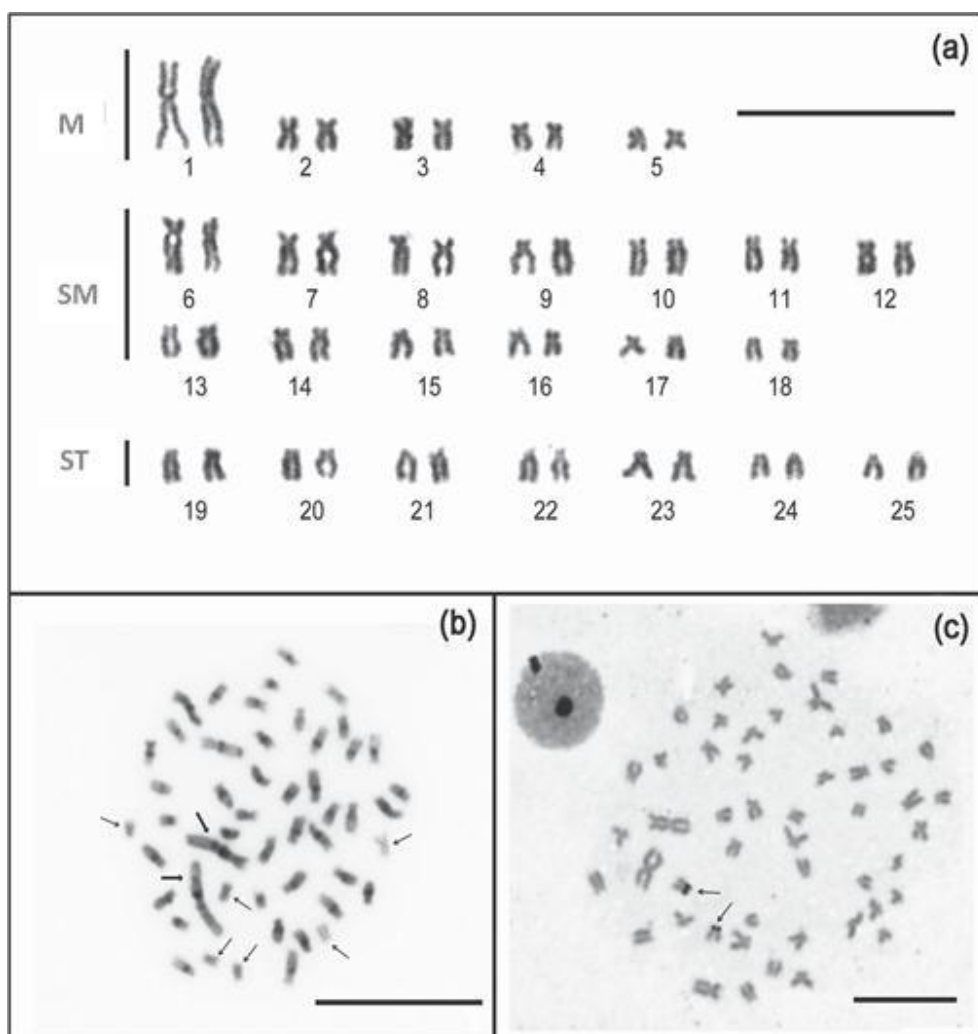
## 4.2 Resultados del Análisis Citogenético

### 4.2.1 *Características citogenéticas*

El análisis de 234 células metafásicas de *R. altipinna* reveló un número modal  $2n = 50$  cromosomas. El cariotipo consistió en 10 elementos metacéntricos, 26 submetacéntricos y 14 elementos subtelocéntricos, con un número fundamental  $FN = 86$  (Fig. 6(a)). El par metacéntrico número 1, es aproximadamente  $\frac{2}{3}$  mayor que la longitud media del resto de los de la serie metacéntrica. No se encontraron diferencias evidentes entre los complementos cromosómicos en ambos sexos.

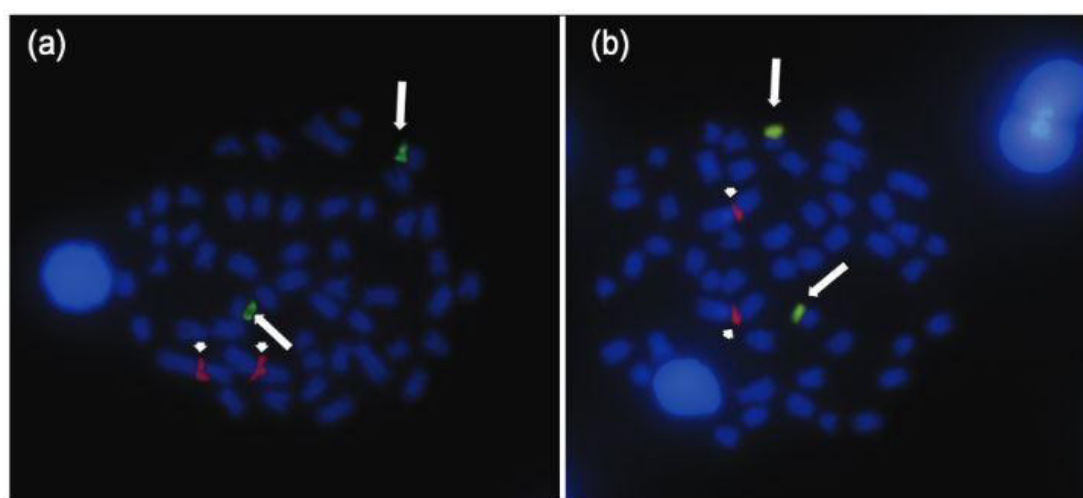
El bandeo C reveló que la heterocromatina constitutiva estuvo distribuida en posición paracentromérica en 44 cromosomas mientras que los seis restantes no presentaron marcas banda-C positivas (Fig. 6(b)). El primer par metacéntrico presentó dos bloques de heterocromatina bien definidos en posición paracentromérica, cercana al centrómero.

La técnica de impregnación con nitrato de plata (Fig. 6(c)) reveló un solo par de Ag-NOR positivos localizados en las regiones terminales de los brazos cortos del par de cromosomas subtelocéntricos número 12.



**Figura 6. Cromosomas de *R. altipinna* (macho). (a) cariotipo con tinción de Giemsa, M: Metacéntrico; SM: submetacéntrico; St-A: Subtelocéntrico-acrocéntrico; (b) metafases somáticas con bandas C – las flechas delgadas indican los cromosomas sin C-bandas y las flechas gruesas la heterocromatina en el par número 1; (c) metafase impregnada con nitrato de plata, las flechas indican las regiones Ag-NOR positivas. Barra = 10 micras.**

El ensayo FISH empleando simultáneamente las sondas 18S y 5S rDNA (Fig. 7) permitió confirmar los dos sitios Ag-NOR y no fue detectado ningún grupo ribosomal principal inactivo adicional (Fig. 7(a)); además, mostró que los grupos de r-DNA menores se localizan intersticialmente en el par metacéntrico más grande número 1 (Fig. 7(b)) y que no existe sintenia con los grupos r-DNA mayores.



**Figura 7. Metafase sometida a Hibridación fluorescente *in situ* con sondas 18-rDNA and 5S-rDNA de *R. altipinna*. La flechas indican las señales 18S-rDNA, las puntas de flecha muestran las señales de hibridación 5- rDNA. Los cromosomas están contrateñidos con DAPI.**

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Test de Micronúcleo

El test de micronúcleo es una técnica económica y sensible para evaluar daños genéticos ocasionados por la exposición a productos químicos y agentes genotóxicos (Al-Sabti y Metcalfe, 1995) que permite detectar fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, producidos por el efecto aneugénico o clastogénico de esos xenobióticos, los cuales en el ciclo mitótico normal quedan rezagados en la anafase mitótica y permanecen en alguna de las células hijas como agregados extranucleares de cromatina (Udroiu, 2006).

Los resultados obtenidos indicaron que la exposición a diferentes dosis de Cloruro de Mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) administradas por vía intraperitoneal en la especie estudiada, provocaron la aparición de células micronucleadas en frecuencias significativamente mayores que las registradas en el grupo control. Estos resultados concuerdan con otros estudios en los que ha sido demostrado que algunas especies de peces son menos sensibles que otras en la respuesta a la inducción de micronúcleos ante xenobioticos (Al-Sabti y Metcalfe 1995; Linde-Arias *et al.*, 2008; Palacio-Betancur *et al.*, 2009). Tal es el caso en *Salmo trutta*, *Phoxinus phoxinus* (Sánchez Galán *et al.*, 1999) y *Channa punctata* (Yadav y Trivedi, 2009) que muestran sensibilidad diferencial a la inducción de la micronúcleos y otras anomalías nucleares en los eritrocitos de sangre periférica después de la administración por inyección intraperitoneal de compuestos mercuriales.

En el caso aquí estudiado, *R. altipinna* demostró poseer una elevada sensibilidad al mercurio.

Es importante señalar que aun cuando en el grupo control se observó la menor frecuencia de micronúcleos, su detección, indica que existe una cantidad basal de estas anomalías nucleares que podría ser explicada como resultado de alteraciones cromosómicas espontáneas. De hecho, la

aparición espontánea de células micronucleadas ha sido reportada en un buen número de especies tales como *Astyanax bimaculatus* (Matsumoto y Cólus, 2000), *Mullus Barbatus* (Bolognesi *et al.*, 2006), *Cyprinus carpio*, (Salvagni *et al.*, 2011) y *Colossoma macropomun* (Rocha *et al.*, 2011).

Si bien es cierto que, en esta investigación, solamente fueron analizadas las variaciones en las frecuencias de eritrocitos micronucleados en respuesta a la exposición al mercurio inorgánico, la detección de otras alteraciones nucleares evidentes (Fig. 3) podrían ser empleadas como lesiones nucleares, más aun cuando un buen número de investigadores que han empleado el ensayo de micronúcleos en distintas especies de peces han considerado estas anomalías como análogas a los micronúcleos (Carrasco *et al.*;1990; Ayllón y Garcia-Vazquez , 2000; 2001; Cavas y Ergene, 2005a,b; Da Silva y Fontanetti, 2006; Ergene *et al.*, 2007; Monteiro *et al.*, 2011). De hecho, en una investigación reciente en la que fue evaluado el efecto genotóxico del cloruro de mercurio en *Andinoacara rivulatus*, un characido endémico de Ecuador, demostró un incremento en la proporción de eritrocitos micronucleados y con muesca en peces expuestos al  $\text{HgCl}_2$  respecto a los del grupo controles revelando una relación directamente proporcional entre la frecuencia de eritrocitos micronucleados y eritrocitos con muescas con un coeficiente de correlación moderadamente fuerte ( $R=0.737$ ) demostrando una elevada sensibilidad de esa especie (Nirchio *et al.*, 2019<sup>b</sup>)

En la Figura 5 se muestra la variación en la proporción de células micronucleadas en función del tiempo de exposición. El análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis para establecer diferencias entre las medianas de la frecuencia de células micronucleadas para los tiempos de exposición ensayados (Tabla 11), reveló diferencias estadísticas significativas lo que permite concluir un efecto importante del factor tiempo en la aparición de micronúcleos. Resultados similares a los que aquí se exponen en relación al efecto del tiempo de exposición a metales pesados sobre la frecuencia de micronúcleos han sido reportados en estudios realizados en *Channa punctata* (Yadav y Trivedi, 2009) que indican incrementos significativos de la frecuencia de células micronucleadas con una relación directamente proporcional al tiempo de exposición



## 5.2 Análisis Citogenético

En cuanto al estudio citogenético de la especie objeto de esta investigación y cuyos resultados ya han sido publicados (Sánchez-Romero *et al.*, 2015), en lo que atañe a este trabajo, las características generales del cariotipo de *R. altipinna* son lo suficientemente detalladas para establecer comparaciones que permitan determinar, en futuros trabajos, daños cromosómicos al comparar cariotipos normales con cariotipos de peces expuestos a sustancias que induzcan efectos clastogénicos y/o aneugénicos. De hecho, la especie presenta cromosomas lo suficientemente grandes como para identificar posibles fracturas. Particularmente el par N° 1 que consiste en homólogos metacéntricos de gran tamaño, pudiera servir como marcador para tratar de visualizar posibles daños macroestructurales, así como también los pares 6, 7, 8, 9 y 10 de la serie subtelocéntrica que presentan los brazos largos con una longitud lo suficientemente grande para detectar fracturas o pérdidas de fragmentos conspicuas, si ese fuere el caso (Fig. 6(a)).

Es importante destacar el hecho de poder identificar los cromosomas portadores de las regiones organizadoras del nucléolo (Fig.6(c)) mediante la técnica de impregnación con Nitrato de Plata (Howell y Black, 1980) ya que esto permitiría explorar la posibilidad de incluir la técnica de impregnación argéntica como alternativa para identificar si algún micronúcleo incluye o no algún cromosoma completo NOR positivo como resultado de daño aneugénico o fragmentos de ellos como consecuencia de daños clastogénicos.

El ensayo FISH empleando simultáneamente las sondas 18S rDNA y 5S rDNA permitió establecer en la especie estudiada que los genes menores (5S rDNA) se localizan en posición intersticial sobre el par metacéntrico de mayor tamaño (N°1) mientras que los genes mayores (18S rDNA) se encuentran en posición terminal en un par acrocéntrico y, por lo tanto, ambos cluster no son sinténicos.

Al igual que en el caso de los genes mayores que como ya fue mencionado, pudieran servir para identificar daños provocados por agentes genotóxicos, siempre y cuando se vean involucradas esas secciones del cromosoma en la

génesis de micronucleos, también sería posible detectar dentro de los micronucleos señales que identifiquen los genes menores aplicando la técnica de Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH).

Cuando un micronucleo está formado por fragmentos acéntricos, se considera de tipo clastogénico, y si está formado por cromosomas completos se considera de tipo aneugénico (Cervantes *et al.*, 2015). Bajo este criterio, detectar el centrómero en los MN podría incrementar la especificidad del ensayo de MN, para poder atribuir su origen a procesos aneugénicos o clastogénicos.

Ya que *Rhoadsia altipinna* posee 44 cromosomas con bloques de heterocromatina bien definidos en posición paracentromérica, existe la posibilidad de detectar micronucleos heterocromáticos después del tratamiento con bandeado C y, por ende, atribuir su origen a procesos aneugénicos.

Incluso, hasta podría aprovecharse la posibilidad de preparar sondas teloméricas y verificar si los micronucleos presentan señales positivas de repeticiones teloméricas mediante hibridación fluorescente *in situ* y así atribuir su origen a procesos clastogénicos.

En cualquier caso, disponer de información citogenética más allá del simple número diploide, abre la posibilidad de iniciar una línea de investigación que involucre aspectos aplicados al estudio del complemento cromosómico de peces que puedan ser empleados como organismos centinela para el monitoreo de los efectos de xenobióticos en el ambiente identificando con más precisión la naturaleza y origen de esos daños, con marcadores específicos.

## 6.CONCLUSIONES

1. En función de que fue posible verificar cambios estadísticamente significativos en la frecuencia de micronúcleos con peces expuestos al Cloruro de mercurio y en el grupo control, se concluye que *R. altipinna* es sensible a los cambios genotóxicos inducidos por la presencia de Cloruro de mercurio bajo condiciones controladas.
2. La administración de Cloruro de mercurio por vía intraperitoneal permitió determinar la magnitud de los daños nucleares en los eritrocitos de *R. altipinna*, y los tipos de anomalías inducidas por este metal pesado, que fueron clasificadas como núcleos arriñonados, con muesca, bi-nucleados y micronúcleos. La exposición de *R. altipinna* a diferentes concentraciones de cloruro de mercurio permitió establecer una relación directamente proporcional entre las concentraciones de mercurio y la presencia de micronúcleos y entre el tiempo de exposición y la presencia de células micronucleadas.
3. Disponer de las características cromosómicas en la especie estudiada y de marcadores citogenéticos específicos como Regiones organizadoras del Nucléolo, Bandas C y número y distribución de genes ribosomales abre la posibilidad de identificar con más precisión la naturaleza y origen de los daños ocasionados por el efecto genotóxico del mercurio mediante técnicas de análisis cromosómico convencionales y moleculares, siempre y cuando la afectación incluya a esos marcadores.

## 7. RECOMENDACIONES

1. Los resultados de este trabajo permitieron obtener datos para evaluar la sensibilidad de la especie en estudio a los efectos genotóxicos del mercurio y, por el otro, la caracterización de su cariotipo. Esta información es de utilidad para estudios que puedan ser diseñados para determinar con precisión el tipo específico de aberraciones cromosómicas inducidas por la exposición al mercurio en *Rhoadsia altipinna*.
2. A la luz de los resultados obtenidos en esta investigación se propone emplear a la especie en estudio como un organismo bioindicador para monitorear el estado ambiental de los cuerpos de agua aledaños a las áreas de la Provincia de El Oro en las que se emplea el mercurio para la explotación artesanal e industrial de oro puesto que estos desechos no son tratados con la conciencia que amerita el manejo de un metal pesado tan tóxico y que al ser vertidos sin discriminación al ambiente, a la postre ingresan a los ríos locales como lixiviado y, en última instancia, pasan a contaminar a los organismos que allí habitan con consecuencias de afectación del patrimonio genético de la biodiversidad local.
3. Los resultados obtenidos permiten proponer la creación de una línea de investigación en la que confluyan la citogenética y las ciencias ambientales para el monitoreo de los efectos de xenobioticos empleando a *R. altipinna* como organismo centinela.
4. Con base en los datos citogenéticos obtenidos a partir de las técnicas de tinción diferencial (Ag-NOR, Bando-C, FISH con sondas específicas) se propone la posibilidad de establecer con más precisión si los daños causados por el mercurio en la especie estudiada derivan de efectos

clastogénicos, aneugénicos o ambos, aprovechando los marcadores citogenéticos disponibles.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali, F.; El-Shehawi, A. y Seehy, M. (2008). Micronucleus test in fish genome: a sensitive monitor for aquatic pollution. *Afr. J. Biotechnol.*, 7 (5): 606-612.

Al-Sabti, K. y Metcalfe, C. (1995). Fish micronuclei for assesing genotoxicity in water. *Mutation research*, (343):121-135.

Alves Al, De Borba RS., Oliveira C., Nirchio M., Granado A., Foresti F. (2012). Karyotypic diversity and evolutionary trends in the Neotropical catsh genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Comp. Cytogen.* 6(4):443-452.

Anual, Z. F. (2014). Exposure assessment for mercury and other metals in commonly consumed fish of west peninsular Malaysia (Doctoral dissertation, University of Canberra).

Argungu, L. A., Siraj, S. S., Christianus, A., Amin, M. S. N., Daud, S. K., Abubakar, M. S., ... y Aliyu-Paiko, M. (2017). A simple and rapid method for blood collection from walking catfish, *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 16(3), 935-944..

Ávila-Pérez, P. (1995). Evaluación de los metales pesados Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb y Hg en agua, sedimento y lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) de la presa José Antonio Alzate, Estado de México (Doctoral dissertation, Tesis de Maestría en Ecología. Universidad Autónoma del Estado de México).

Ayllón, F., Garcia-Vazquez, E., (2000). Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: An assessment of the fish micronucleus test. *Mutat. Res.* 467: 177-186

Ayllón, F., Garcia-Vazquez, E., (2001). Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 49, 221-225. <http://dx.doi.org/10.1006/eesa.2001.2065>

Bardiene, J.; Dedonyte, V.; Rybakovas, A.; Andreikenaite, L. y Odd-Ketil, A. (2005). Induction of micronuclei in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and

turbot (*Scophthalmus maximus*) after treatment with bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether-47. *Ekologija*, 4: 1-7.

Barriga, R. S. (2012) Lista de peces de agua dulce e intermareales del Ecuador. *Revista Politécnica* 30(3): 83-119.

Belpaeme, K., Delbeke, K., Zhu, L., y Kirsch-Volders, M. (1996). Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 11(5), 485-492.

Berlin, M.; Zalups, R. K. (2007). Mercury. Chapter 33 in:(eds). Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L. Handbook on the toxicology of metals 3<sup>rd</sup> ed. ISBN 978-0-12-3694213-3. Academic Press Publishers, Elsevier. 943pp.

Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S. y Moreira F, O. (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil. J. Genet.*, 1: 103-120.

Bolognesi, C., Landini, E., Roggieri, P., Fabbri, R., Viarengo, A. (1999). Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. *Environ Mol Mutagen* 33:287-292.

Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D.M. and Sciutto, A (2006). Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquat.Toxicol*, 78:93-98.

Bradl, HB. (2005). Heavy Metals in the environment. Chapter 1: Sources and origins of heavy metals. Ed. H.B. Bradl.

Buckup, P. A. (1998). Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei, Ostariophysi). In: Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS (Eds.). Porto Alegre, Edipucrs, 123-143.

Buhl KJ. (1997). Relative sensitivity of three endangered fishes, Colorado squawfish, bonytail, and razorback sucker, to selected metal pollutants. *Ecotoxicology Environmental and Safety*, 37 (2): 186-192.

Cajaraville, M.; Bebianno, M.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, C. y Viarengo, A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.*, 247: 295-311.

Campana, A., Panzeri, M., Escalante, A., Moreno, V., Dulout, N. (2001). Micronucleus test in fish from a pampasic pond (Argentina): an estimation of

the presence of genotoxic compounds. *Journal of Environment Pathology Toxicology Oncology*, 20(4):325-31.

Cardoso, A. R. (2003) Subfamily Rhoasiinae (Characins, tetras). In: Reis RE, Kullander SE, Ferraris CJ Jr (Eds) Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs, 213–214

Cardoso, P. G., Marques, S. C., D'Ambrosio, M., Pereira, E., Duarte, A. C., Azeiteiro, U. M., y Pardal, M. Â. (2013). Changes in zooplankton communities along a mercury contamination gradient in a coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). *Marine pollution bulletin*, 76(1-2), 170-177.

Carmona, G., Villasana, L., Pérez, E., y Peña, M. (2005). Metales Pesados Tomo II: El mercurio un enemigo invisible. The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspec.* 110: p11-23.

Carranza, L. P. (2011). Cuantificación de micronúcleos en células de sangre periférica de mototaxistas que trabajan en la ciudad de Cartagena de Indias. Trabajo de grado Magister en Toxicología. Bogota D.C: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina, 2011. p. 35

Carrasco, K., Tilbury, K.L., Myers, M.S., (1990). Assessment of the piscine micronucleus test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects. *Can J Fish Aquat Sci.* 47, 2123– 2136. <http://dx.doi.org/10.1139/f90-237>

Cavas, T., Ergene-Gozukara, S., (2005<sup>a</sup>). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat Toxicol.* 74.

Cavas, T., Ergene-Gozukara, S., (2005<sup>b</sup>). Micronucleus test in fish cells: a bioassay for *in situ* monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environ Mol Mutagen.* 46:64–70.

Cervantes, R., E., Cruz, L. R., Guerrero, J. G., y Muñiz, A. R. O. (2015). Evaluación de la frecuencia y tipo de micronúcleos en niños con desnutrición moderada y grave. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 30, 23-35.

Cole, C. J. y Andy Leavens, C. R. (1971). Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. - *Herpefol. Rev.* 3: 102

Comings, O.E. (1978). Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Ann. Rev. Genet.* 12:25-46.

Córdova D. (2006) Toxicología. 5ª edición. México: Editorial El Manual Moderno SAB/DACS

Crespo-López, M. E., Herculano, A. M., Corvelo, T. C., y Do Nascimento, J. M. (2005). Mercurio y neurotoxicidad. *Rev Neurol*, 40(7), 441-447. Mercurio y neurotoxicidad. *Rev Neurol*. 2005; 40(7):441-447.

Da Silva Souza, T., Fontanetti, C. S., (2006). Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutat. Res.* 605(1–2):87–93.

Dabeka, R., McKenzie, A. D., Forsyth, D. S., y Conacher, H. B. S. (2004). Survey of total mercury in some edible fish and shellfish species collected in Canada in 2002. *Food Additives and Contaminants*, 21(5), 434-440.

Díaz Mayans J, Torreblanca A, Del Ramo J. (1993). Presencia de metales en el medio acuático. En: Mas A, Azcue JM. Metales en sistemas biológicos. Primera Edición. Barcelona: Promociones y Publicaciones Universitarias S.A., p.187-206.

Diniz, D., A. Laudicina y Bertollo, L. A. C. (2009). Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triportheus* fish species (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 32: 37-41.

Diniz D, Bertollo LAC. (2003). Karyotypic studies on *Hoplerethrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. *Caryologia* 56: 303–311. doi: 10.1080/00087114.2003.10589339

Ergene, S., Cavaş, T., Çelik, A., Köleli, N., Kaya, F., Karajan, A., (2007). Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology*. 16(4), 385-391.

Eschmeyer WN., Fong JD. (2014) Species by Family/Subfamily. (<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>).

Fenech M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay involves into a —cytomell assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research*. 600: 58-66.

Fenech M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols*. 2. (5).

Géry, J., (1977). Characoids of the world. Neptune City; Reigate : T.F.H. 672 p.

Gil, M. J., Soto, A. M., Usma, J. I., y Gutiérrez, O. D. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción+ limpia*, 7: 52-73.



Gobierno Autónomo descentralizado de la Parroquia rural El Progreso (2016). "Actualización del Plan de desarrollo y ordenamiento territorial 2015 – 2020"

Grandjean, P. (2017). Mercury. En: Heggenhougen K. International Encyclopedia of Public Health. 2<sup>nd</sup> Edition. Amsterdam: Elsevier; p. 110-116.

Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinae, N. Saotome, K., Tanaka, N., Takai, A., Sasaki, F., Asano, N., Sofuni, T., Ojima, Y. (1998). Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. Mutation Research, (399): 125-133.

Heddle, J. (1973). A rapid in vivo test for chromosomal damage. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. Volume 18, Issue 2, p 187-190

Howell, W. M. y Black, D. A. (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36: 1014-1015.

<http://www.fishbase.org/summary/Rhoadsia-altipinna.html>

Junín, M., Rodríguez Mendoza, N., Heras, M., y Braga, L. (2008). Valoración preliminar de la utilización de bioindicadores de contaminación en algunas especies de peces del delta del río Paraná, argentina. Ciencias Ambientales, 1, 17–24.

Kandiel, M. M., El-Asely, A. M., Radwan, H. A., y Abbass, A. A. (2014). Modulation of genotoxicity and endocrine disruptive effects of malathion by dietary honeybee pollen and propolis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of advanced research, 5(6), 671-684.

Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LA and Moreira-Filho O. (2005). Molecular cytogenetics of *Oligosarcus hepsetus* (Teleostei, Characiformes) from two Brazilian locations. Genetica 124: 85-91

Kiely, G. (1999). Ingeniería ambiental. Fundamentos, entornos, tecnologías y sistemas de gestión, McGraw Hill, Madrid, 1331 pp

Korringa, P., Hagel, P. (1974). En: Proceedings of the International CEC Symposium on the Problems of Contamination of Man and his Environment by Mercury and Cadmium. Luxemburgo: Center for Information and Documentation (CID).

Lee MR., Elder FFB. (1980). Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. Cytogenetics and Cell Genetics 26: 36-40.

Lenntech, K. (2004). Water treatment and air purification. Published by Rotter Dam Seweg, Netherlands.

Levan, A., Fredga K. y Sandberg A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.

Linde-Arias, A. R., Inácio, A. F., de Albuquerque, C., Freire, M. M., y Moreira, J. C. (2008). Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River. *Science of the Total Environment*, 399(1): 186-192

Liu, JL., Xu, XR., Yu, S., *et al.* (2014). Mercury contamination in fish and human hair from Hainan Island, South China Sea: Implication for human exposure. *Environ Res.* 135:42-47.

Loh M, Vita WF, Vu V, Navarrete R, Calle P, Shervette VR, Torres A, Aguirre WE (2014) Isolation of sixteen microsatellite loci for *Rhoadsia altipinna* (Characiformes: Characidae) from an impacted river basin in western Ecuador. *Conservation Genetics Resources* 6: 229-231, DOI 10.1007/s12686-013-0062-y.

Lozano R, Ruiz Rejon C, Ruiz Rejon M., Stain Technol. (1988). A method for increasing the number of mitoses available for cytogenetic analysis in rainbow trout. *Stain Technol.* 66: 335–338. [PubMed]

Lucena CAS (1993) Estudo Filogenético da Família Characidae com uma Discussão dos Grupos Naturais Propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). Unpublished Ph.D. Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo, 158p.

Marcano, V., Troconis, A. (2001). Evaluación de contenido de mercurio en el pescado expendido en la ciudad de Mérida, Venezuela. *Rev Eco Lat Am.* 8:15-24.

Márquez, A., Senior, W., Fermín, I., Martínez, G., Castañeda, J. y González, A. (2008). Cuantificación de las concentraciones de metales pesados en tejidos de peces y crustáceos de la Laguna de Unare, estado Anzoátegui, Venezuela. *Rev. Cient.* 18 (1):73-86.

Martínez, S. (2005). El cerdo joven como bioindicador de concentraciones bajas de genotóxicas, mediante la prueba de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica. Trabajo de grado Doctor en Ciencias básicas. Colima, México: Universidad de Colima. Facultad de Medicina, 2005. p. 21

Matsumoto FE, Cólus IMS. (2000) Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genetics and Molecular Biology*.; 23: 489-492.

Matthey, R. (1945). - L'évolution de la formule chromosomiale chez les Vertébrés. *Experientia*, 1: 50-56; 78-86.

Matthey, R. (1965). Un type nouveau de chromosomes sexuels multiples chez une souris africaine du groupe *Mus* (*Leggata*) minutoides (Mammalia-Rodentia). Male: X1X2/Y. Femelle: X1X2/X1X2. *Chromosoma* 16: 351-364.

Mero, M. (2010). Determinación de metales pesados (Cd y Pb) en moluscos bivalvos de interés comercial de cuatro esteros del golfo de Guayaquil. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Estatal de Guayaquil, Guayaquil, 61p.

Mersch, J.; Beauvais, M. y Nagel, P. (1996). Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mutat. Res.*, 371: 47-55.

Minissi, S., Ciccotti, E., Rizzoni, M. (1996). Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the *in situ* detection of mutagens in freshwater. *Mutation Research*, (367): 245-251

Mir, M. I., Khan, S., Bhat, S. A., Reshi, A. A., Shah, F. A., Balki, M. H., y Manzoor, R. (2014). Scenario of Genotoxicity in Fishes and Its Impact on Fish Industry. *IOSR-JESTFT*, 8(6), 2319-2402.

Monteiro, V., Cavalcante, D.G.S.M., Viléla, M.B.F.A., Sofia, S.H., Martinez, C.B.R., (2011). In vivo and in vitro exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic toxicology*. 104(3-4), 291-298.

Morcillo, P., Esteban, M. A., y Cuesta, A. (2017). Mercury and its toxic effects on fish. *AIMS Environmental Science*, 4(3): 386-402. DOI: 10.3934/environsci.2017.3.386

Movimiento Mundial por los Bosques Tropicales, WRM. (2004). Guyana: El impacto de las transnacionales mineras sobre la gente y el ambiente. ISBN: 9974-7782-5-5. <http://www.wrm.org.uy>

Nabi, S. (2014). Toxic Effects of Mercury (Vol. 423). Springer, 268 pp.

National Research Council NRC. (2000). Toxicological effects of methylmercury. National Academies Press.

Nirchio, M. y Oliveira C. (2014). Citogenética como herramienta taxonómica en peces, Revista saber, Universidad de Oriente, Venezuela. Vol. 26 N. 4 361-372

Nirchio M., J. I. Gaviria; C. Oliveira; F. Foresti; V. Milana, A. R. Rossi. (2019<sup>a</sup>). Chromosomal polymorphism and molecular variability in *Xyrichtys novacula* (Linnaeus 1758) (Perciformes: Labridae) from Caribbean and Mediterranean seas: Taxonomic and biogeographic implications (Submitted)

Nirchio, M., O.Choco, P. Quizhpe-Cordero, J.G.Hernández y Oliveira (2019<sup>b</sup>). Genotoxic effects of mercury chloride on the Neotropical fish *Andinoacara rivulatus* (Cichlidae: Cichlasomatini). Revista de Biología Tropical (en prensa)

Nirchio, M., Paim, F. G., Milana, V., Rossi, A. R., y Oliveira, C. (2018). Identification of a New Mullet Species Complex Based on an Integrative Molecular and Cytogenetic Investigation of *Mugil hospes* (Mugilidae: Mugiliformes). Frontiers in Genetics, 9, 17. doi: 10.3389/fgene.2018.00017

Nirchio, M; Oliveira, C; Siccha-Ramirez, Z. R; De Sene, V. F; Sola, L; Milana, V; y Rossi, A. R. (2017). The *Mugil curema* species complex (Pisces, Mugilidae): a new karyotype for the Pacific white mullet mitochondrial lineage. Comparative Cytogenetics, 11, 225.

Nirchio, M; C. Oliveira; Z. R. Siccha-Ramirez; V. F. Sene; O. R. Sánchez-Romero; N. R. Ehemann; V. Milana; A. R. Rossi y L. Sola (2016). Cryptic Caribbean species of *Scorpaena* (Actinopterygii: Scorpaeniformes) suggested by cytogenetic and molecular data. Journal of Fish Biology. DOI: 10.1111/jfb.13089.

Nirchio M, Cervigón F, Porto J, Pérez J, Gómez JA, Villalaz J (2003<sup>a</sup>) Cytogenetic confirmation of *Mugil curema* Valenciennes, 1836 and *Mugil gaimardianus* Desmarest, 1831 (Mugilidae: Teleostei) as valid nominal species. Scientia Marina 67(1): 113-115.

Nirchio M, Cipriano R, Cestari MM, Fenocchio A. (2005). Cytogenetical and morphological features reveal significant differences among Venezuelan and Brazilian samples of *Mugil curema* (Teleostei: Mugilidae). Neotropical Ichthyology 3(1): 99-102.

Nirchio M, Fenocchio AS, Swarça AC, Pérez JE, Granado A, Estrada A, Ron E (2003<sup>b</sup>) Cytogenetic characterization of hybrids offspring between *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) and *Piaractus brachipomus* (Cuvier, 1817) from Caicara del Orinoco, Venezuela. Caryologia 56(4): 405-411.

Nirchio M, González D, Pérez JE. (2001). Estudio citogenético de *Mugil curema* y *M. liza* (Pisces: Mugilidae): Regiones organizadoras del nucléolo. Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela Universidad de Oriente 40: 3-7.

Nirchio M, Oliveira C, Ferreira IA, Pérez JE, Gaviria JI, Harrison I, Rossi AR, Sola L. (2007). Comparative cytogenetic and allozyme analysis of *Mugil rubrioculus* and *M. curema* (Teleostei: Mugilidae) from Venezuela. Interciencia 32 (11): 757-762.

Nirchio M, Oliveira C. (2006). Citogenética de peces. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 216 pp.

Nirchio M, Rondón R, Oliveira C, Ferreira IA, Martins C, Pérez J, Sola L, Rossi AR. (2008). Cytogenetic studies in three species of *Lutjanus* (Perciformes, Lutjanidae, Lutjaninae) from the Island of Margarita, Venezuela. Neotropical Ichthyology 6(1): 101-108.

Nirchio M, Rossi AR, Foresti F, Oliveira C. (2014). Chromosome evolution in fishes: a new challenging proposal from Neotropical species. Neotropical Ichthyology 12(4):761-770.

Nirchio M., Gaviria JI., Oliveira C., Ferreira IA., Martins C. (2006) Cytogenetic analysis of three species of the genus *Haemulon* (Teleostei: Haemulinae) from Margarita island, Venezuela. Genetica 131(2): 135-140.

Oliveira, C., Almeida-Toledo, and Toledo-Filho, S. A. (1988<sup>b</sup>). Supranumerary chromosomes, Robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). Caryologia 41: 227-236

Oliveira, C., Almeida-Toledo, L. F., Foresti, F., Britski, H. A. and Toledo-Filho, S. A. (1988<sup>a</sup>). Chromosome formulae of Neotropical Freshwater fishes. Rev. Brasil. Genet. 11: 577-624.

Oliveira, C., Foresti, F., Hilsdorf AWS. (2009) Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. Fish Physiology Biochemistry 35: 81-100.

Olmedo, P., Pla, A., Hernández, AF., *et al.* (2013). Determination of toxic elements (mercury, cadmium, lead, tin and arsenic) in fish and shellfish samples. Risk assessment for the consumers. Environ Int. 59:63-72.

Palacio-Betancur, I., Palacio-Baena, J. A., y Camargo Guerrero, M. (2009). Micronuclei test application to wild tropical ichthyic species common in two lentic environments of the low zones in Colombia. Actualidades Biológicas, 31(90): 67-77.

Palíková, M., Rábová, M., Krejčí, R., Navrátil, S., y Bláha, L. (2007). Chromosomal Aberrations in Early Embryos of Weatherfish (*Misgurnus fossilis* L.) Exposed to Crude Cyanobacterial Extract and Semipurified Compound of Microcystins-a Pilot Study. *Acta Veterinaria Brno*, 76(8), 55-60.

Pendás, AM., Morán, P., Freije, JP., García-Vazquez, E. (1994). Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet Cell Genet*, 67: 31-36.

Pinkel D., Straume T., Gray JW. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May;83(9):2934-8.

Prieto, F.; Baez, O.; Scout, W.; Gaytan, J. y Zuniga, A. (2007). Toxicidad y teratogénesis por arsenico en aguas en el pez cebra (*Danio reiro*). *Rev. Toxicol.*, 24: 18-22.

Rajeshkumar S., Munuswamy N. (2011). Impact of metals on histopathology and expression of HSP 70 in different tissues of Milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattuppalli Island, South East Coast, India. *Chemosphere* 83, 415–421.

Registro Oficial (2008). Constitución de la República del Ecuador. Año II, Quito, Lunes 20 de Octubre del 2008 - Nº 449, 80 pp STICKNEY RR (1993) *Tilapia*. En: Stickney RR (ed) *Culture of non-salmonid freshwater fishes*: 81-115. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Reilly C. (1991). *Metal contamination of food*. 2<sup>nd</sup> Edition. London: Elsevier Applied Science.

Rocha, C., Cavalcanti, B., Pessoa, C. O., Cunha, L., Pinheiro, R. H., Bahia, M., Ribeiro L., Cestari M y Burbano, R. (2011). Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Aequidens tetramerus* exposed to methylmercury. *in vivo*, 25(6), 929-933.

Rovira, J. (1993). Contaminación por metales pesados en los sedimentos del río Jarama y su asimilación en tubificidos. Tesis Doctoral, Universidad Complutense, Madrid, 360 p.

Salvagni J, Zeni R, Fuentefria A. (2011). Assessment of the genotoxic impact of pesticides on farming communities in the countryside of Santa Catarina State, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*.; 34: 122-126.

Samanta, S., Dey, P. (2010). Micronucleus and its applications. *Diagnostic Cytopathology*.

Sanchez-Galán, S., Linde, A.R., Garcia-Vazquez, E. (1999). Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: differential sensitivity to heavy metals. *Ecotoxicol Environ Saf.* 43, 301-304.

Sánchez-Romero, O., Quezada, C., Quihzpe, P., de Sene, V. F., Nirchio, M., y Oliveira, C. (2015). First description of the karyotype and localization of major and minor ribosomal genes in *Rhoadsia altipinna* Fowler, 1911 (Characiformes, Characidae) from Ecuador. *Comparative cytogenetics*, 9(2), 271.

Sandoval, F. (2001). La pequeña minería en El Ecuador. IIED. Mining, Minerals and Sustainable Development is a project of the International Institute for Environment and Development (IIED). The project was made possible by the support of the World Business Council for Sustainable Development (WBCSD). IIED is a company limited by guarantee and incorporated in England. Reg. No. 2188452. VAT Reg. No. GB 440 4948 50. Registered Charity No. 800066

Sarkar, A.; Ray, D.; Shrivastava, A. y Sarker, S. (2006). Molecular biomarkers: their significance and application marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*, 15 (4): 333-340.

Sepici-Dincel, A., Sahin, D., Karasu Benli, A. C., Sarikaya, R., Selvi, M., Erkoc, F., y Altan, N. (2011). Genotoxicity assessment of carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings by tissue DNA damage and micronucleus test, after environmental exposure to fenitrothion. *Toxicology mechanisms and methods*, 21(5), 388-392.

Siu, W.; Mak, E.; Cao, J.; de Luca-Abbott, S.; Richardson, B. y Lam, P. (2004). Micronucleus induction in gill cells of green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23 (5): 1317–1325.

Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. (1979). *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. Ed. Blume, Madrid. 832 pp.

Sotil, G.; Alvis, R.; Francia, J. y Shiga, B. (2007). Aplicación de dos biomarcadores para el análisis de lesiones en el DNA de bivalvos marinos. *Rev. Peru. Biol.*, 13 (3): 249 -253.

Statgraphics Centurion, X. V. I. (2009). Statpoint technologies. INC. version, 16, 17.

Sumner AT. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.

Swain, E. B.; Jakus, P. M., Rice G., Lupi F., Maxson P.A., Pacyna J.M., Penn A., Spiegel S.J., y Veiga M.M. (2007). Socioeconomic consequences of mercury use and pollution. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 36(1), 45-61.

Talapatra, S.; Ganguly, P.; Mukhopadhyay, A. y Banerjee, S. (2006). Assessment of genetic biomarkers with special referent to micronucleated and binucleated erythrocytes in two fish species grown at industrial vicinity of thermal power plants, Kolkata, India. *Asian J. Water, Environ. Pollut.*, 4 (1): 139-144.

Taleb, Z.; Benghali, S.; Kaddour, A. y Boutiba, Z. (2007). Monitoring the biological effects of pollution on the Algerian west coast using mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Oceanologia*, 49 (4): 543–564.

Tassi F; Cabassi J, Calabrese S, *et al.* (2016). Diffuse soil gas emissions of gaseous elemental mercury (GEM) from hydrothermal-volcanic systems: An innovative approach by using the static closed-chamber method. *Appl Geochem.* 66:234-241.

Thier, R., Bonacker, D., Stoiber, T., Böhm, K. J., Wang, M., Unger, E y Degen, G. (2003). Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems. *Toxicology Letters*, 140:, 75-81.

Tice, R., Agurell, E., Andrson, E., Burlingson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., and Sasaki, Y. F. (2000). Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo Genetic Toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagenesis.*, 35, 206-221.

Udroiu, I. (2006). The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*, 79(2), 201-204.

UNEP. (2002). Report of the Global Mercury Assessment Working Group on the Work of its First Meeting. Geneva.

Urech, M., Pickl, Ch., Lehmann, H. (2001). Investigation on the mutagenicity of 1800 MHZ GSM- and UMTS- electromagnetic fields with the *Tradescantia* micronucleus bioassay. Puls Environmental Consulting, CH-3007, Bern, Switzerland

Venier, P., Maron, S., Canova, S. (1997). Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a]pyrene. *Mutation Research*, (390): 33-44.

Walker, TR. (2016). Mercury concentrations in marine sediments near a former mercury cell chlor-alkali plant in Eastern Canada. *Mar Pollut Bull.* 107:398-401.



White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor L. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press Inc., London/New York, 312–315. doi: 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1.

Xu, L., Zheng, G. J., Lam, P. K., y Richardson, B. J. (1999). Relationship between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA adducts in green-lipped mussels (*Perna viridis*). *Ecotoxicology*, 8(2), 73-82. Xu, L.; Zheng, G.; Lam, P. y Richardson, B. 1999. Relationship between tissue

Yacuzzi, E. (2008). Chisso Corporation y la Enfermedad de Minamata. Buenos Aires: Documentos de Trabajo. Universidad del Cema. Disponible en : <http://www.ucema.edu.ar/publicaciones/download/documentos/391.pdf>

Yadav, K. K., y Trivedi, S. P. (2009). Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctata*. *Chemosphere*, 77(11), 1495-1500.

Zalacáin M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. 28. (2).

## 9. ANEXOS

### ANEXO 1

www.ecuadorencifras.com

CANTON	PARROQUIA	HOMBRE	MUJER	TOTAL
PASAJE	PROGRESO	2.079	1.888	3.967

CONDENSADO DE LAS ENTREVISTAS ANEXO 1				
PREGUNTAS		# ENTREVISTADOS	TOTAL	Especies citadas
¿Sabe Ud. que especies de peces habitan en el río Dos Bocas?	SI	13	15	Vieja azul, Dama, Raspa balsa, Pampanito, Raspa balsa, Chillo, Dama, Guanchinche, Guaija, Ratón, Vieja colorada, Raspa balsa
	NO	2		
¿Puede indicarnos que especies de plantas circundan al río Dos Bocas?	SI	12	15	Cacao tradicional y orgánico, papaya, mandarina, naranjas, fruta de pan, banano seda y filipino, limón, zapote, naranja, guanábana, mamey, guaba, grosella,
	NO	3		
¿Conoce Ud. que especies de animales,	SI	11	15	Serpientes X, colambo, coral, chonta, algunas variedades de

aves, roedores etc., habitan en la zona del río Dos Bocas?	<b>NO</b>	<b>4</b>	lagartijas, ranas. Entre las aves mencionan al garrapatero, loros, perdiz, palomas silvestres, horneros, algunas variedades de colibríes, pacharacos, puerco sajino, iguanas.
--	-----------	----------	---

Plantilla de preguntas para la descripción ecológica-ambiental de la zona del río Dos Bocas

<b>PREGUNTA</b>		<b>NOMBRE COMÚN DE ESPECIES</b>
¿Sabe Ud. que especies de peces habitan en el río Dos Bocas?	<p>Si</p> <p>No</p> <p>Si su respuesta es positiva por favor indique sus nombres comunes.</p>	
¿Puede indicarnos que especies de plantas circundan al río Dos Bocas?	<p>Si</p> <p>No</p> <p>Si su respuesta es positiva por favor indique sus nombres comunes</p>	
¿Conoce Ud. que especies de animales, aves, roedores etc., habitan en la zona del río Dos Bocas?	<p>Si</p> <p>No</p>	

	Si su respuesta es positiva por favor indique sus nombres comunes	
--	---	--

## ANEXO 2

**Tabla 1**

Breve detalle de la Ictiofauna del río Dos Bocas

ICTIOFAUNA	
Nombre científico	Nombre común
<i>Andinoacara rivulatus</i>	Vieja azul
<i>Plecostomus sp</i>	Raspa balsa
<i>Rhoadsia altipinna</i>	Pampanito
<i>Pimelodella elongata</i>	Chillo
<i>Brycon atrocaudatus</i>	Dama
<i>Brycon ecuadoriensis</i>	Dama
<i>Bryconamericus bucayensis</i>	Dica
<i>Bryconamericus orencis</i>	Dica
<i>Chaetostoma byfurcum</i>	Raspa balsa
<i>Chaetostoma sp</i>	Raspa balsa
<i>Chilobrycon dauterodon</i>	Dica
<i>Cichlasoma festae</i>	Vieja colorada
<i>Hoplias microlepis</i>	Guanchinche
<i>Ituglanis laticeps</i>	
<i>Lebiasina bimaculata</i>	Guaija
<i>Leporinus ecuadorinsis</i>	Ratón
<i>Phenacobrycon henni</i>	
<i>Pseudocurimata trosheli</i>	
<i>Pseudopoecilia fría</i>	

Elaborado. El autor  
Fuente. Nirchio. sf. Entrevistas

ta personal.

### **ANEXO 3**

First description of the karyotype and localization of major and minor ribosomal genes in *Rhoadsia altipinna* Fowler, 1911 (Characiformes, Characidae) from Ecuador. Comparative cytogenetic (Sánchez-Romero *et al.*, 2015)